

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

## NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 15 février 2000 (15.02.00)	
Demande internationale no PCT/FR99/01453	Référence du dossier du déposant ou du mandataire ST98017
Date du dépôt international (jour/mois/année) 17 juin 1999 (17.06.99)	Date de priorité (jour/mois/année) 17 juin 1998 (17.06.98)
Déposant PARKER, Fabienne etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

27 décembre 1999 (27.12.99)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection



a été faite



n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

R. Raissi

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

## TRAITE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT  
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et  
instruction administrative 422 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

DERNONCOUR, Roxane  
Aventis Pharma  
Direction Brevets- Tri LE1 144  
20, avenue Raymond-Aron  
F-92165 Antony Cedex  
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 15 février 2000 (15.02.00)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire ST98017	
Demande internationale no PCT/FR99/01453	Date du dépôt international (jour/mois/année) 17 juin 1999 (17.06.99)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:		
<input checked="" type="checkbox"/> le déposant	<input type="checkbox"/> l'inventeur	<input type="checkbox"/> le mandataire <input type="checkbox"/> le représentant commun
Nom et adresse RHONE-POULENC RORER S.A. 20, avenue Raymond Aron F-92160 Antony FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de téléimprimeur	
2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:		
<input type="checkbox"/> la personne	<input checked="" type="checkbox"/> le nom	<input type="checkbox"/> l'adresse <input type="checkbox"/> la nationalité <input type="checkbox"/> le domicile
Nom et adresse AVENTIS PHARMA S.A. 20, avenue Raymond Aron F-92160 Antony FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de téléimprimeur	
3. Observations complémentaires, le cas échéant:		
4. Une copie de cette notification a été envoyée:		
<input checked="" type="checkbox"/> à l'office récepteur	<input type="checkbox"/> aux offices désignés concernés	
<input type="checkbox"/> à l'administration chargée de la recherche internationale	<input checked="" type="checkbox"/> aux offices élus concernés	
<input checked="" type="checkbox"/> à l'administration chargée de l'examen préliminaire international	<input type="checkbox"/> autre destinataire:	

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé:  R. Raissi
no de télécopieur (41-22) 740.14.35	no de téléphone (41-22) 338.83.38

## TRAITE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT  
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et  
instruction administrative 422 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

DERNONCOUR, Roxane  
Aventis Pharma  
Direction Brevets- Tri LE1 144  
20, avenue Raymond-Aron  
F-92165 Antony Cedex  
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 15 février 2000 (15.02.00)	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire ST98017	NOTIFICATION IMPORTANTE
Demande internationale no PCT/FR99/01453	Date du dépôt international (jour/mois/année) 17 juin 1999 (17.06.99)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:		
<input type="checkbox"/> le déposant	<input type="checkbox"/> l'inventeur	<input checked="" type="checkbox"/> le mandataire
<input type="checkbox"/> le représentant commun		
Nom et adresse DERNONCOUR, Roxane Rhone-Poulenc Rorer S.A. Direction Brevets 20, avenue Raymond Aron F-92165 Antony Cedex FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat)	Domicile (nom de l'Etat)
	no de téléphone 01 55 71 70 36	
	no de télécopieur 01 55 71 72 91	
	no de téléimprimeur	
2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:		
<input type="checkbox"/> la personne	<input type="checkbox"/> le nom	<input checked="" type="checkbox"/> l'adresse
<input type="checkbox"/> la nationalité		
<input type="checkbox"/> le domicile		
Nom et adresse DERNONCOUR, Roxane Aventis Pharma Direction Brevets- Tri LE1 144 20, avenue Raymond-Aron F-92165 Antony Cedex FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat)	Domicile (nom de l'Etat)
	no de téléphone 33 1 55 71 71 71	
	no de télécopieur 33 1 47 02 50 14	
	no de téléimprimeur	
3. Observations complémentaires, le cas échéant:		
4. Une copie de cette notification a été envoyée:		
<input checked="" type="checkbox"/> à l'office récepteur	<input type="checkbox"/> aux offices désignés concernés	
<input type="checkbox"/> à l'administration chargée de la recherche internationale	<input checked="" type="checkbox"/> aux offices élus concernés	
<input checked="" type="checkbox"/> à l'administration chargée de l'examen préliminaire international	<input type="checkbox"/> autre destinataire:	

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse  no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé:  R. Raissi  no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	---

# PCT

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire <b>ST98017</b>	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° <b>PCT/FR 99/ 01453</b>	Date du dépôt international (jour/mois/année) <b>17/06/1999</b>	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) <b>17/06/1998</b>
Déposant  <b>RHONE-POULENC ROPER S.A.</b>		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

### 1. Base du rapport

a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.

☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

b. En ce qui concerne **les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :

☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.

☒ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☒ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

☒ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'**abrégé**,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure **des dessins** à publier avec l'abrégé est la Figure n°

☐ suggérée par le déposant.

☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☒ Aucune des figures n'est à publier.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 99/01453

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**

CIB 6 C07K16/18 A61K39/395 C12N5/20 C12N15/06 G01N33/577  
G01N33/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 96 16169 A (RHONE-POULENC RORER) 30 mai 1996 (1996-05-30) cité dans la demande le document en entier ---	1-12
A	F. PARKER ET AL.: "A Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein." MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 16, no. 6, juin 1996 (1996-06), pages 2561-2569, XP002092186 Washington, DC, états-unis cité dans la demande le document en entier page 2562, colonne de gauche, ligne 4 - ligne 15 --- -/--	1-12

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

16 décembre 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

12/01/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Nooij, F

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Requête Internationale No

PCT/FR 99/01453

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>M. DUCHESNE ET AL.: "Identification of the SH3 domain of GAP as an essential sequence for Ras_GAP-mediated signaling." SCIENCE, vol. 259, no. 5094, 22 janvier 1993 (1993-01-22), pages 525-528, XP002092187 Washington, DC, états-unis le document en entier -----</p>	1-12

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/01453

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9616169 A	30-05-1996	FR 2727116 A	24-05-1996
		FR 2734266 A	22-11-1996
		AU 4263696 A	17-06-1996
		BR 9510067 A	30-12-1997
		CZ 9701545 A	15-10-1997
		EP 0793721 A	10-09-1997
		FI 972170 A	21-05-1997
		HU 77029 A	02-03-1998
		JP 10509044 T	08-09-1998
		NO 972313 A	21-05-1997
		SK 62997 A	04-02-1998
		US 5886150 A	23-03-1999
		ZA 9509882 A	01-01-1996

---

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

REC'D 25 AUG 2000

### RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

PCT

(article 36 et règle 70 du PCT)



Référence du dossier du déposant ou du mandataire ST98017	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/01453	Date du dépôt international (jour/mois/année) 17/06/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 17/06/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C07K16/18		
Déposant AVENTIS PHARMA S.A. et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 7 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
  - ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☒ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☒ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 27/12/1999	Date d'achèvement du présent rapport 23.08.2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Renggli, J  N° de téléphone +49 89 2399 7461



**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/01453

**I. Base du rapport**

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

**Description, pages:**

1-35                      version initiale

**Revendications, N°:**

1-12                      version initiale

**Dessins, feuilles:**

1/5-5/5                      version initiale

**2. Les modifications ont entraîné l'annulation :**

- ☐ de la description,      pages :
- ☐ des revendications,    n°s :
- ☐ des dessins,            feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

**4. Observations complémentaires, le cas échéant :**

**voir feuille séparée**

**III. Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle**

La question de savoir si l'objet de l'invention revendiquée semble être nouveau, impliquer une activité inventive (ne pas être évident) ou être susceptible d'application industrielle n'a pas été examinée pour ce qui concerne :

- ☐ l'ensemble de la demande internationale.
- ☒ les revendications n°s 11 en ce qui concerne l'application industrielle.

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/01453

parce que :

- ☒ la demande internationale, ou les revendications n°s 11 en ce qui concerne l'application industrielle en question, se rapportent à l'objet suivant, à l'égard duquel l'administration chargée de l'examen préliminaire international n'est pas tenue effectuer un examen préliminaire international (*préciser*) :

**voir feuille séparée**

- ☐ la description, les revendications ou les dessins (*en indiquer les éléments ci-dessous*), ou les revendications n°s en question ne sont pas clairs, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable (*préciser*) :

- ☐ les revendications, ou les revendications n°s en question, ne se fondent pas de façon adéquate sur la description, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable.

- ☐ il n'a pas été établi de rapport de recherche internationale pour les revendications n°s en question.

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

**1. Déclaration**

Nouveauté	Oui : Revendications 4, 9 Non : Revendications 1-3, 5-8, 10-12
Activité inventive	Oui : Revendications Non : Revendications 1-12
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-10, 12 Non : Revendications

**2. Citations et explications**

**voir feuille séparée**

**VII. Irrégularités dans la demande internationale**

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :

**voir feuille séparée**

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/01453

---

**VIII. Observations relatives à la demande internationale**

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

**voir feuille séparée**

## **Section I: Remarques additionnelles**

Les pages du listage des séquences 1-11 déposées par lettre du 22.11.1999 ne font pas partie de la demande (règle 13<sup>ter</sup>.1 f) PCT).

## **Section III:**

La présente Administration considère que l'objet de la revendication 11 est visé par les dispositions de la règle 67.1 (iv) PCT. C'est pourquoi il ne sera pas émis d'opinion quant à la question de savoir si l'objet de cette revendication est susceptible d'application industrielle (article 34(4) a) i) PCT; Directives PCT Section IV, IV-2.4 d) et IV-2.5).

Il n'existe pas de critère unifié dans les Etats parties au PCT pour déterminer si la revendication 11 est susceptible d'application industrielle. La brevetabilité peut aussi dépendre de la manière dont la revendication a été formulée. Ainsi, l'Office européen des brevets ne considère pas comme susceptible d'application industrielle l'objet de revendications d'utilisation d'un composé à des fins médicales. Par contre, peuvent être acceptées des revendications relatives à un composé connu, pour une première utilisation à des fins médicales ainsi que des revendications relatives à l'utilisation d'un tel composé dans la fabrication d'un médicament en vue d'un nouveau traitement médical.

## **Section V:**

1. Il est fait référence aux documents suivants:

D1 WO 96/16169

D2 Parker F. et al., Molecular and Cellular Biology, 1996, Vol. 16, No. 6,  
pp. 2561-2569

2. Application industrielle (Art. 33(4) PCT):

Le contenu des revendications 1-10 et 12 est susceptible d'application industrielle.

3. Nouveauté et Activité inventive (Art. 33(2) et (3) PCT):

Le document D1 décrit la protéine G3BP et des anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre ladite protéine. L'utilisation diagnostique et médicamenteuse desdits anticorps est également mentionnée, ce dans le cadre du cancer (cf. page 4, ligne 13-page 5, ligne 16; page 8, lignes 3-19; page 8, lignes 27-33; page 9, lignes 3-14; revendications 8-10 et 18-22). D1 indique que G3BP est une cible particulièrement prometteuse pour le traitement du cancer (cf page 14, lignes 32-34).

A la lumière de D1, le contenu des revendications 1-3, 5-8 et 10-12 n'est donc pas nouveau (Art. 33(2) PCT).

En ce qui concerne la caractéristique fonctionnelle "capable d'induire l'apoptose dans différents types de cellules tumorales" (voir revendications 1, 7 et 10), l'autorité chargée de l'examen préliminaire international est actuellement de l'avis que D1 la contient de manière implicite (voir Directives PCT, Section IV, IV-7.2, 7.3, 7.5). Un anticorps permettant de lutter contre la prolifération de cancers (voir D1, page 8, lignes 10-19; page 9, lignes 3-6) semble englober tous les phénomènes biologiques pouvant permettre d'arriver à ce résultat (par exemple l'apoptose).

Par contre, D1 ne décrit pas l'anticorps/hybridôme déposés au C.N.C.M comme revendiqués dans les revendications 4 et 9; lesdites revendications sont donc nouvelles par rapport à D1 (Art. 33(2) PCT).

L'anticorps et lignée d'hybridome objets des revendications 4 et 9 ne semblent par contre pas résoudre un problème technique qui ne puisse être résolu par les anticorps déjà décrits dans D1. Par conséquent, les revendications 4 et 9 ne semblent pas inventives (Art. 33(3) PCT).

Une opinion concernant D2 et certaines revendications qui ne semblent pas inventives à la lumière de ce document est également donnée. D2 décrit des anticorps polyclonaux dirigés contre G3BP (voir page 2562, chapitre "antibodies").

D2 décrit de plus la séquence de G3BP (voir D2, page 2565, fig. 3). Les revendications 1-12 sont nouvelles par rapport à D2 qui ne décrit pas d'anticorps monoclonaux (Art. 33(2) PCT).

Cependant, l'objet des revendications 2, 3 et 12 semble représenter une alternative triviale par rapport aux anticorps décrits dans D2, puisque l'homme du métier possède toutes les informations et tous les outils nécessaires au développement des anticorps monoclonaux / kit des revendications 2, 3 et 12 de la présente demande (voir aussi les Directives PCT, section IV, III-4.8 pour la revendication 12).

Il est de plus noté que les anticorps dirigés contre tous les épitopes inclus dans les séquences 1-144 ou 1-72 ne semble pas liés de façon automatique à une/des caractéristique(s) fonctionnelle(s) particulière(s) (voir description de la demande, page 26, lignes 1-3).

Les revendications 2, 3 et 12 de la présente demande ne semblent donc de plus (voir D1 ci-dessus) pas inventives par rapport à D2.

## **Section VII**

L'expression "incorporé par référence" contrevient aux Directives PCT, Gazette PCT-Section IV, II- 4.17, cf. pages 4 et 5 de la description.

## **Section VIII**

Les termes "de préférence" et "éventuellement", utilisés respectivement dans les revendications 3 et 7, rendent les caractéristiques techniques auxquelles ils se réfèrent facultatives et introduisent un manque de clarté dans lesdites revendications (article 6 PCT et Directives PCT, Gazette PCT-Section IV, III-4.6).

09/719758  
(3810)  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference ST98017	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR99/01453	International filing date (day/month/year) 17 June 1999 (17.06.99)	Priority date (day/month/year) 17 June 1998 (17.06.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 16/18		
Applicant AVENTIS PHARMA S.A.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet.  <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).  These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:  I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 27 December 1999 (27.12.99)	Date of completion of this report 23 August 2000 (23.08.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP  Facsimile No.	Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/01453

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.):

☐ the international application as originally filed.

☒ the description, pages 1-35, as originally filed,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

☒ the claims, Nos. 1-12, as originally filed,  
Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

☒ the drawings, sheets/fig 1/5-5/5, as originally filed,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages \_\_\_\_\_

☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_

☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/01453

## III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 11

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 11 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

**See the separate sheet.**

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ the claims, or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☐ no international search report has been established for said claims Nos. \_\_\_\_\_

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/FR 99/01453

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

The pages for the listing of the sequences 1 to 11  
filed with the letter dated 22 November 1999 do not  
form part of the application (PCT Rule 13ter.1(f)).

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/FR 99/01453

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

The present Authority considers that the subject matter of Claim 11 is covered by the provisions of PCT Rule 67.1(iv). For that reason, no opinion will be given as to whether the subject matter of this claim is industrially applicable (PCT Article 34(4)(a)(i); PCT International Preliminary Examination Guidelines, IV-2.4(d) and IV-2.5). The PCT Contracting States do not have uniform criteria for assessing the industrial applicability of Claim 11. Patentability may also depend on the wording of the claim. The EPO, for example, does not recognize the industrial applicability of claims to the medical use of a compound; it does, however, allow claims to the first medical use of a known compound or to the use of such a compound in the manufacture of a drug for a new medical application.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/FR 99/01453

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	4, 9	YES
	Claims	1-3, 5-8, 10-12	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-12	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-10, 12	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

#### 1. Reference is made to the following documents:

D1: WO-A-96/16169;

D2: Parker F. et al., Molecular and Cellular Biology, 1996, Vol.16, No.6, pp.2561-2569.

#### 2. Industrial applicability (PCT Article 33(4)):

The content of Claims 1 to 10 and 12 is industrially applicable.

#### 3. Novelty and inventive step (PCT Article 33(2) and (3)):

Document D1 describes the protein G3BP and polyclonal or monoclonal antibodies directed against said protein. The diagnostic and medicinal use of said antibodies is also mentioned in connection with cancer (cf. page 4, line 13 to page 5, line 16; page 8, lines 3 to 19; page 8, lines 27 to 33; page 9, lines 3 to 14; Claims 8 to 10 and 18 to 22). D1 indicates that G3BP is a particularly promising target for the treatment of cancer (cf. page 14, lines 32-34).

In the light of D1, the content of Claims 1 to 3, 5 to 8 and 10 to 12 is not therefore novel (PCT Article 33(2)).

As regards the functional feature "able to induce apoptosis in different types of tumorous cells" (see Claims 1, 7 and 10), the International Preliminary Examining Authority is currently of the opinion that D1 contains this feature implicitly (see PCT International Preliminary Examination Guidelines, IV-7.2, 7.3 and 7.5). An antibody for combating the proliferation of cancers (see D1, page 8, lines 10 to 19; page 9, lines 3 to 6) appears to incorporate all the biological phenomena for achieving this result (for example apoptosis).

By contrast, D1 does not describe the antibody/hybridoma filed with the C.N.C.M. as claimed in Claims 4 and 9; said claims are therefore novel over D1 (PCT Article 33(2)).

The antibody and hybridoma line referred to in Claims 4 and 9 do not appear, by contrast, to solve a technical problem which cannot be solved by the antibodies already described in D1. Consequently, Claims 4 and 9 do not appear to be inventive (PCT Article 33(3)).

An opinion relating to D2 and certain claims that do not appear to be inventive in the light of said document is also given. D2 describes polyclonal antibodies directed against G3BP (see page 2562, "antibodies" chapter).

D2 also describes the G3BP sequence (see D2, page

2565, Figure 3). Claims 1 to 12 are novel over D2, which does not describe any monoclonal antibodies (PCT Article 33(2)).

However, the subject matter of Claims 2, 3 and 12 appears to represent a commonplace alternative to the antibodies described in D2, since a person skilled in the art has all the information and tools necessary for developing the monoclonal antibodies/kit of Claims 2, 3 and 12 of the present application (see also PCT International Preliminary Examination Guidelines, III-4.8 for Claim 12).

It is also noted that the antibodies directed against all the epitopes included in sequences 1 to 144 and 1 to 72 do not appear to be automatically linked to one or more special functional features (see description of the application, page 26, lines 1 to 3).

Claims 2, 3 and 12 of the present application do not therefore appear (see D1 above) to be inventive either with respect to D2.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/FR 99/01453

**VII. Certain defects in the international application**

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

The phrase "incorporated by reference" contravenes the PCT International Preliminary Examination Guidelines, PCT Gazette Section IV, II-4.17, cf. pages 4 and 5 of the description.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 99/01453

## VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The terms "preferably" and "possibly", used in Claims 3 and 7 respectively, make the technical features to which they refer optional and result in a lack of clarity in said claims (PCT Article 6 and PCT International Preliminary Examination Guidelines, PCT Gazette Section IV, III-4.6).





## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C07K 16/18, A61K 39/395, C12N 5/20, 15/06, C12P 21/08, G01N 33/577, 33/574</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 99/65947</b> <b>(43) Date de publication internationale: 23 décembre 1999 (23.12.99)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR99/01453 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 17 juin 1999 (17.06.99) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 98/07617 17 juin 1998 (17.06.98) FR <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond Aron, F-92160 Antony (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> <u>PARKER</u> , Fabienne [FR/FR]; 27, rue de la Fonte des Godets, F-92160 Antony (FR). <u>KENIGSBERG</u> , Mireille [FR/FR]; 69, rue de la Garenne, F-91230 Montgeron (FR). <u>DUCHESNE</u> , Marc [FR/FR]; 71, rue du Général de Laminat, F-94370 Sucy-en-Brie (FR). <u>BARLAT</u> , Isabelle [FR/FR]; 14, rue du 8 Mai 1945, F-94510 La-Queu-en-Brie (FR). <b>(74) Mandataire:</b> DERNONCOUR, Roxane; Rhone-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond Aron, F-92165 Antony Cedex (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AE, AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Publiée</b> <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>
<b>(54) Title:</b> MONOCLONAL ANTIBODIES DIRECTED AGAINST THE G3BP PROTEIN, AND USES <b>(54) Titre:</b> ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGES CONTRE LA PROTEINE G3BP, ET LEURS UTILISATIONS <b>(57) Abstract</b> The invention concerns monoclonal antibodies directed against the G3BP protein and cell lines producing them. The invention also concerns the use of said antibodies or their derivatives for obtaining medicines and diagnostic reagents. <b>(57) Abrégé</b> La présente invention concerne des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine G3BP ainsi que les lignées cellulaires les produisant. L'invention concerne également l'utilisation de ces anticorps ou de leurs dérivés pour l'obtention de médicaments et de réactifs de diagnostic.		

# UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce			TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PL	Pologne		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	PT	Portugal		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SD	Soudan		
DK	Danemark	LR	Libéria	SE	Suède		
EE	Estonie			SG	Singapour		

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr. Application No  
PCT/FR 99/01453

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K16/18 A61K39/395 C12N5/20 C12N15/06 G01N33/577  
G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 16169 A (RHONE-POULENC RORER) 30 May 1996 (1996-05-30) cited in the application the whole document	1-12
A	F. PARKER ET AL.: "A Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein." MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 16, no. 6, June 1996 (1996-06), pages 2561-2569, XP002092186 Washington, DC, états-unis cited in the application the whole document page 2562, left-hand column, line 4 - line 15	1-12
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 December 1999

Date of mailing of the international search report

12/01/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nooij, F

Inter: Patent Application No  
PCT/FR 99/01453

Inter: Patent Application No  
PCT/FR 99/01453

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>M. DUCHESNE ET AL.: "Identification of the SH3 domain of GAP as an essential sequence for Ras_GAP-mediated signaling." SCIENCE, vol. 259, no. 5094, 22 January 1993 (1993-01-22), pages 525-528, XP002092187 Washington, DC, états-unis the whole document -----</p>	1-12

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/01453

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9616169 A	30-05-1996	FR 2727116 A	24-05-1996
		FR 2734266 A	22-11-1996
		AU 4263696 A	17-06-1996
		BR 9510067 A	30-12-1997
		CZ 9701545 A	15-10-1997
		EP 0793721 A	10-09-1997
		FI 972170 A	21-05-1997
		HU 77029 A	02-03-1998
		JP 10509044 T	08-09-1998
		NO 972313 A	21-05-1997
		SK 62997 A	04-02-1998
		US 5886150 A	23-03-1999
		ZA 9509882 A	01-01-1996
<hr/>			

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dém. Internationale No  
PCT/FR 99/01453

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 6 C07K16/18 A61K39/395 C12N5/20 C12N15/06 G01N33/577 G01N33/68		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b>		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C07K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 96 16169 A (RHONE-POULENC RORER) 30 mai 1996 (1996-05-30) cité dans la demande le document en entier ---	1-12
A	F. PARKER ET AL.: "A Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein." MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 16, no. 6, juin 1996 (1996-06), pages 2561-2569, XP002092186 Washington, DC, états-unis cité dans la demande le document en entier page 2562, colonne de gauche, ligne 4 - ligne 15 ---	1-12
	-/-	
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe</span> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">16 décembre 1999</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">12/01/2000</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Nooij, F</div>

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Déposé International No  
PCT/FR 99/01453

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>M. DUCHESNE ET AL.: "Identification of the SH3 domain of GAP as an essential sequence for Ras_GAP-mediated signaling." SCIENCE, vol. 259, no. 5094, 22 janvier 1993 (1993-01-22), pages 525-528, XP002092187 Washington, DC, états-unis le document en entier</p> <p>-----</p>	1-12

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 99/01453

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9616169 A	30-05-1996	FR 2727116 A	24-05-1996
		FR 2734266 A	22-11-1996
		AU 4263696 A	17-06-1996
		BR 9510067 A	30-12-1997
		CZ 9701545 A	15-10-1997
		EP 0793721 A	10-09-1997
		FI 972170 A	21-05-1997
		HU 77029 A	02-03-1998
		JP 10509044 T	08-09-1998
		NO 972313 A	21-05-1997
		SK 62997 A	04-02-1998
		US 5886150 A	23-03-1999
		ZA 9509882 A	01-01-1996



ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGES CONTRE LA PROTEINE  
5 G3BP, ET LEURS UTILISATIONS

La présente invention concerne des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine G3BP ainsi que les lignées cellulaires les produisant. L'invention concerne également l'utilisation de ces anticorps ou de leurs dérivés pour l'obtention  
10 de médicaments et de réactifs de diagnostique.

Les produits des gènes ras, généralement désignés protéines p21Ras, jouent un rôle clé dans le contrôle de la division cellulaire chez tous les organismes eucaryotes où ils ont été recherchés. Certaines modifications spécifiques de ces protéines leur font perdre leur contrôle normal et les conduisent à devenir oncogéniques. Ainsi, un  
15 grand nombre de tumeurs humaines ont été associées à la présence de gènes ras modifiés. De même, une surexpression des protéines p21Ras peut conduire à un dérèglement de la prolifération cellulaire. Globalement, les protéines p21Ras sont impliquées dans 30% des cancers humains.

La compréhension du rôle exact de ces protéines p21Ras constitue donc un des  
20 objectifs cibles de la recherche dans le domaine de l'oncologie.

Le modèle dont on dispose actuellement pour expliquer le fonctionnement des protéines p21Ras repose sur des analogies qu'elles partagent avec les protéines G de transduction. Il existe dans les cellules un équilibre entre les protéines p21 actives, liées à du GTP et les formes inactives, ayant fixé du GDP. Dans une cellule  
25 quiescente, où les protéines Ras ne sont pas sollicitées, la majorité d'entre elles sont sous forme GDP. Lorsque la cellule est stimulée, le facteur d'échange des nucléotides,

GEF, devient plus actif et facilite l'évacuation du GDP et son remplacement par du GTP. La protéine adopte alors une conformation active qui lui permet de reconnaître et de stimuler son effecteur, la protéine GAP "GTPase activating protein". Le complexe Ras-GTP-GAP interagit vraisemblablement à son tour avec une ou d'autres protéine(s) permettant ainsi la transmission du signal qui entraîne une réponse biologique de la cellule. L'association de Ras-GTP avec GAP déclenche simultanément l'hydrolyse du GTP et le retour de la protéine Ras vers la forme inactive, GDP.

Dans le cas des protéines p21Ras oncogènes, la mutation qu'elles portent empêche le retour à l'état inactif. L'équilibre est dans ce dernier cas, déplacé vers la forme active de Ras.

Cet équilibre complexe entre les formes active et inactive des p21Ras est contrôlé à la fois par des facteurs inhérents aux propriétés biochimiques des protéines Ras (affinité relative pour le GDP et le GTP, vitesse d'échange des nucléotides ...) et des facteurs externes modulant leur activité comme notamment la protéine GAP.

La protéine GAP est une protéine cytosolique présente chez tous les organismes eucaryotes qui possède donc la faculté d'accélérer fortement l'hydrolyse du GTP, lié à la protéine p21 normale (Trahey et Mc Cormick 1987). Elle possède deux domaines assurant des fonctions distinctes. Son extrémité carboxy-terminale porte l'activité catalytique qui fixe les protéines Ras et augmente leur activité GTPase. Sur son autre extrémité, en aval de la partie amino-terminale, se trouve une juxtaposition de domaines SH2 et SH3 qui sont susceptibles de participer à des interactions avec d'autres protéines.

La demanderesse a déjà identifié une protéine supplémentaire dans la cascade de la signalisation Ras-dépendante. Ainsi, la demande WO96/16169 décrit l'identification, le clonage, le séquençage et la caractérisation d'une protéine capable de lier le domaine SH3 de GAP, désignée G3BP ("GAP-SH3 Binding Protein"). Cette demande montre en particulier que G3BP est un effecteur de GAP, c'est-à-dire un

partenaire intervenant en aval dans la voie de signalisation Ras-dépendante. Ainsi, l'article de Parker et al (Mol. Cell. Biol. 16 (1996) 2561) décrit la séquence de cette protéine, sa capacité à lier GAP, etc. Cette protéine constitue une nouvelle cible majeure dans la mise au point d'approches thérapeutiques anti-cancéreuses.

5           La protéine G3BP est une protéine cytosolique de 68 kDa exprimée de façon ubiquitaire. La séquence de la protéine G3BP et du gène correspondant sont présentées dans les SEQ ID n°1 et SEQ ID n° 2. Cette protéine de 466 acides aminés appartient à la famille des hnRNP (heterogeneous nuclear RiboNucleoproteins) et contient plusieurs domaines caractéristiques des protéines qui se lient à l'ARN :

- 10           - un domaine RRM (aa 342-385) avec les domaines RNP2 (aa 342-347) et RNP1 (aa 378 à 385)  
              - un domaine riche en acides aminés Arginine , Glycine (aa 429 à 461)  
              - un domaine auxiliaire acide (aa 144 à 221)

15           La demanderesse s'est maintenant intéressée au mécanisme d'action de la protéine G3BP. Dans cette optique, la demanderesse a obtenu différents anticorps dirigés contre différents domaines de la protéine G3BP afin d'antagoniser l'activité de G3BP ou de constituer des effecteurs de G3BP.

20           La présente invention repose d'une part sur la mise en évidence d'une surexpression de la protéine G3BP dans les cellules tumorales et dans les tumeurs humaines (adenocarcinome du colon, et tumeur du sein) et d'autre part sur la découverte surprenante que certains anticorps dirigés contre la protéine G3BP sont capables d'induire l'apoptose dans les cellules tumorales humaines. De manière inattendue, il a été constaté que ces anticorps induisent l'apoptose dans les cellules tumorales dans lesquelles la protéine G3BP est surexprimée mais se révèlent non  
25           toxiques dans les cellules humaines normales, où G3BP est faiblement exprimée.

Un premier objet de l'invention concerne des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine G3BP et capables d'induire l'apoptose dans différents types de cellules tumorales.

Plus particulièrement, l'invention a pour objet des anticorps monoclonaux capables de reconnaître un épitope situé dans la partie N-terminale de la protéine G3BP. De manière avantageuse, il s'agit d'un épitope compris entre les acides aminés situés aux positions 1 et 144 de la protéine G3BP et de préférence il s'agit d'un épitope compris entre les acides aminés situés aux positions 1 à 72 de la protéine G3BP. De préférence encore, il s'agit d'un épitope compris entre les acides aminés situés aux positions 22 à 55 de la protéine G3BP, et plus préférentiellement encore d'un épitope constitué par les acides aminés situés aux positions 22-34.

Dans un mode particulièrement avantageux, la présente invention concerne des anticorps désignés par l'appellation Mab 1F1 et sécrétés par la lignée d'hybridome G3B 1F1 1D1 déposée le 9 juin 1998 auprès de la C.N.C.M. sous le numéro I-2038.

L'invention englobe également les anticorps dérivés des anticorps monoclonaux définis ci-avant. Au sens de la présente invention, on entend par anticorps dérivés toute molécule qui comprend l'idiotype des anticorps monoclonaux selon l'invention et notamment les anticorps chimériques, les anticorps simple chaîne et les fragments Fab. De tels anticorps chimériques peuvent être obtenus selon les techniques décrites par Morrison et al., J. Bacteriol. 159 : 870 (1984) ; Neberger et al., Nature 312:604-608 (1984) ; Takeda et al., Nature 314:452-454 (1985), incorporées à la présente par référence. Les fragments Fab qui contiennent l'idiotype des anticorps selon l'invention peuvent être générés par toute technique connue de l'homme du métier. Par exemple de tels fragments comportent de manière non limitative : le fragment  $F(ab')_2$ , fragment qui peut être produit par digestion par la pepsine de l'anticorps ; les fragments Fab' qui peuvent être obtenus par réduction des ponts

disulfure du fragment  $F(ab)_2$ , et les fragments Fab qui peuvent être produits par traitement de l'anticorps avec la papaïne et un agent réducteur.

L'invention a également pour objet des anticorps simple chaîne ScFv dérivés des anticorps monoclonaux définis ci-avant. De tel anticorps simple chaîne peuvent  
5 être obtenus selon les techniques décrites dans les brevet US 4,946,778, US 5,132,405 et US 5,476,786.

L'invention concerne également une séquence d'acides nucléiques comprenant un gène codant pour un anticorps simple chaîne dérivé des anticorps monoclonaux décrits ci-avant. L'obtention de telles séquences et leur utilisation pour  
10 l'expression in vivo d'anticorps a été décrite dans la demande WO 94/29446 incorporée par référence à la présente.

L'invention a également pour objet des vecteurs viraux ou plasmidiques contenant une séquence d'acide nucléique codant pour un anticorps simple chaîne dérivé des anticorps monoclonaux décrits ci-avant. Plus particulièrement, les  
15 vecteurs de l'invention sont d'origine virale, tels que les rétrovirus, les adénovirus, les virus adéno-associés, le virus de l'herpès, le virus de la vaccine, le virus HSV, etc.

L'invention concerne également l'utilisation de séquences d'acides nucléiques codant pour ces ScFv ou de vecteurs les incluant pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement chirurgical ou thérapeutique du  
20 corps humain ou animal. Elle concerne aussi toute composition pharmaceutique comprenant un vecteurs, notamment viral, ou une séquence d'acides nucléiques tels que définis ci-avant.

L'invention a également pour objet les lignées d'hybridomes susceptibles de sécréter les anticorps monoclonaux selon l'invention.

25 L'invention a plus particulièrement pour objet la lignée d'hybridome G3B 1F1 1D1 sécrétant l'anticorps Mab 1F1 déposée le 9 juin 1998 auprès de la Collection Nationale des Cultures de Microorganismes (C.N.C.M.) sous le numéro I-2038.

L'invention concerne également un procédé de production d'anticorps monoclonaux capables d'induire l'apoptose dans différentes lignées tumorales comprenant (1) la fusion de cellules spléniques d'un animal immunisé à l'aide de la protéine G3BP ou d'un fragment comprenant au moins une partie du domaine N-terminal (aa 1-144), avec des cellules myelomateuses dans des conditions permettant la formation d'hybridomes ; (2), la détection et l'isolement de ceux desdits hybridomes qui sécrètent des anticorps monoclonaux capables d'induire l'apoptose dans différentes lignées tumorales.

L'invention concerne également l'utilisation des anticorps définis ci-avant pour l'obtention de médicaments. L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation desdits anticorps pour l'obtention d'un médicament destinés au traitement ou à la prévention des désordres hyperprolifératifs.

L'invention a également pour objet des compositions pharmaceutiques comprenant une quantité thérapeutiquement efficace des anticorps selon l'invention, éventuellement mélangés à un support pharmaceutiquement acceptable, ladite quantité étant thérapeutiquement efficace pour induire l'apoptose dans des cellules tumorales.

---

Les anticorps selon l'invention peuvent également être utilisés comme réactif de diagnostic pour identifier ou doser la protéine G3BP. En effet, il a été constaté que la protéine G3BP est surexprimée dans les cellules tumorales et que cette surexpression constitue un marqueur dans les phénomènes de prolifération cellulaire. Ces anticorps sont donc particulièrement utiles pour diagnostiquer des maladies hyperprolifératives entraînant une surexpression de la protéine G3BP.

L'invention a donc également pour objet l'utilisation des anticorps monoclonaux définis ci-avant comme réactif de diagnostic ainsi qu'un kit de diagnostic immunologique comprenant lesdits anticorps monoclonaux.

Les anticorps peuvent être couplés à des marqueurs chromogènes, fluorescents, biotinylés, radioactifs ou autres ... Les anticorps peuvent être utilisés dans des méthodes d'immunomarquage en immunohistochimie, en cytométrie de flux, pour des dosages radioimmunologiques (RIA) ou immunoenzymatiques (ELISA) et dans tout type de kits de diagnostic connu.

Les anticorps selon l'invention ont également permis de réaliser une étude fonctionnelle de la protéine G3BP. En particulier, cette étude fonctionnelle a conduit à l'identification de nouveaux peptides dérivés de la protéine G3BP et qui présentent une activité apoptotique. A cet égard, l'invention a également pour objet de nouveaux peptides dérivés de la protéine G3BP et capable d'induire l'apoptose. De préférence, les peptides selon l'invention comprennent le fragment N-terminal, et de préférence encore ces polypeptides comprennent au moins le domaine correspondant aux 14 premiers acides aminés de la protéine G3BP.

Outre les dispositions qui précèdent, la présente invention comprend également d'autres caractéristiques et avantages qui ressortiront des exemples qui vont suivre, et qui doivent être considérés comme illustrant l'invention sans en limiter la portée

---

#### LEGENDES DES FIGURES

Figure 1 : Identification par Western Blot des différents domaines de G3BP reconnus par l'anticorps Mab 1F1

Figure 2 a et 2 b : Comparaison du niveau d'expression de la protéine G3BP dans différentes lignées cellulaires.

Figure 3 : Effet de la microinjection d'anticorps Mab 1F1 dans les cellules HCT116.

Figure 4 : Comparaison de séquences entre les protéines humaines G3BP et G3BP2. La comparaison des séquences N-terminales fait apparaître plusieurs différences mises en évidence par les trémas.

## MATERIELS ET METHODES

### 5 Lignées cellulaires utilisées

HCT116: cellules épithéliales issues de carcinome de colon humain présentant un gène *Ki-ras* muté et une mutation du gène suppresseur de tumeur DCC. Milieu de culture requis : DMEM, 10% Serum de veau foetal, 1% Penicilline/ Streptomycine, 1% Glutamine.

10 Hke-3 et HK2-6 : cellules HCT116 modifiées par délétion du gène *Ki-ras* et qui, de ce fait ont perdu leur pouvoir tumorigène. (ref: Shirasawa,..Sasazuki. (1993) Science 260, 85-88). Milieu de culture requis : DMEM, 10% Serum de veau foetal, 400µg/ml Geneticine, 1% Penicilline/ Streptomycine, 1% Glutamine.

15 H460 : cellules épithéliales issues de carcinome pulmonaire non à petites cellules humain présentant un gène *Ki-ras* muté. Milieu de culture requis : DMEM, 10% Sérum de veau foetal, 1% Penicilline/ Streptomycine, 1% Glutamine.

20 H1299 : provenance ATCC. Cellules épithéliales issues de carcinome pulmonaire humain présentant un gène *N-ras* muté et une délétion du gène p53. Milieu de culture requis : DMEM, 10% Serum de veau foetal, 1% Penicilline/ Streptomycine, 1% Glutamine.

HeLa : cellules épithéliales issues de carcinome humain du col de l'utérus ne présentant pas de mutation des gènes *ras*. Milieu de culture requis : DMEM, 10% Sérum de veau foetal, 1% Pénicilline/ Streptomycine, 1% Glutamine.

25 HT-29 : provenance ATCC. Cellules épithéliales issues de carcinome de colon humain présentant une mutation du gène p53 mais pas de mutations des gènes *ras*.



Milieu de culture requis : DMEM, 10% Sérum de veau foetal, 1% Pénicilline/ Streptomycine, 1% Glutamine.

DLD-1 : provenance ATCC. Cellules épithéliales issues de carcinome de colon humain présentant une mutation du gène *Ki-ras* et du gène p53. Milieu de culture requis : DMEM, 10% Sérum de veau foetal, 1% Pénicilline/ Streptomycine, 1% Glutamine.

T47 : provenance ATCC. Cellules isolées à partir d'effusion pleurale d'une patiente atteinte de carcinome mammaire. Milieu de culture requis : RPMI, 10% sérum de veau foetal, 1% Pénicilline/ Streptomycine, 1% Glutamine.

10 BT20 : Cellules issues de carcinome mammaire humain. Milieu de culture requis : RPMI, 10% sérum de veau foetal, 1% Pénicilline/ Streptomycine, 1% Glutamine.

MCF-7 : Cellules issues de carcinome mammaire humain. Milieu de culture requis : RPMI, 10% sérum de veau foetal, 1% Pénicilline/ Streptomycine, 1% Glutamine.

T24 : provenance ATCC. Cellules issues de carcinome humain de la vessie, présentant une mutation du gène *Ha-ras*. Milieu de culture requis : RPMI, 10% sérum de veau foetal, 1% Pénicilline/ Streptomycine, 1% Glutamine.

NHDF : provenance Boehringer Ingelheim. Normal Human Dermal Fibroblasts (adult) en culture primaire ne présentant pas de gènes mutés. Milieu requis du fournisseur.

## EXEMPLES

### Exemple 1 : Obtention des anticorps monoclonaux

### 1.1 - Production de la protéine G3BP

Les cultures de cellules SF9 ont été réalisées selon le protocole décrit dans Parker et al (Mol. Cell. Biol. 16 (1996) 2561). Les cellules sont lysées en présence de tampon HNTG (50 mM d'Hépès, pH 7,5, 150 mM de NaCl, 1 % de Triton X100, 10  
5 % de Glycérol, 1mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1mM d'EGTA; en présence d'inhibiteurs de phosphatases (1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10mM de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 10 mM de NaF) et d'inhibiteurs de protéases (1 $\mu\text{g/ml}$  de leupeptine, 1  $\mu\text{g/ml}$  d'inhibiteur de trypsine, 1  $\mu\text{g/ml}$  de pepstatine A, 2  $\mu\text{g/ml}$  d'aprotinine, 10  $\mu\text{g/ml}$  de benzamidine, 1 mM de phénylméthanesulfonyle fluorure, 1  $\mu\text{g/ml}$  d'antipain, 1  $\mu\text{g/ml}$  de chymostatine). Le  
10 lysat est centrifugé (15.000 g, 15 min.) et dilué 5 fois dans du tampon de lavage HG (50 mM Hepes pH 7.5, glycérol 10 %, 1 mM EGTA, en présence d'inhibiteurs de phosphatases et d'inhibiteurs de protéases). Le lysat est ensuite incubé 12 heures en présence du gel Heparin-Sepharose Fast Flow gel (Pharmacia LKB) à raison de 15 mg de protéines par millilitre de gel, équilibré dans le même tampon (50 mM Hepes,  
15 0.030 M NaCl, 0.2 % Triton X100, glycérol 10 %,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, 1 mM EGTA). Le complexe est transféré dans une colonne K26 Pharmacia. La colonne est lavée avec 10 volumes de tampon d'équilibration (50 ml/heure), puis les protéines sont éluées en tampon NaCl 100 mM puis en tampon NaCl 600 mM. Les fractions contenant l'activité de liaison GAP-SH3 sont rassemblées, diluées 10 fois en tampon HG et  
20 chargées sur une colonne d'agarose-polyribouridylic acid AGPOLY(U), (colonne de type 6, 19  $\text{cm}^2 \times 1 \text{ cm}$ , Pharmacia) à raison de 1.3 mg de protéines par millilitre de gel. La colonne est pré-équilibrée dans le même tampon avec un débit de 5  $\text{ml} / \text{cm}^2 \text{ h}^{-1}$ . Après lavage en tampon HNG (60 mM NaCl), les protéines contaminantes sont éluées avec 229 ml d'un tampon en gradient linéaire de 0.06 à 0.32 M NaCl, et la  
25 protéine G3BP est éluee en présence de NaCl 0.7 M. A l'issue de la chromatographie POLY(U), les fractions contenant la protéine G3BP sont rassemblées, diluée 12 fois en présence de tampon phosphate pH 7.5 + inhibiteurs de protéases) et chargées sur une colonne MonoS HR5/5 1 ml (Pharmacia), pré-équilibrée dans le même tampon contenant 60 mM NaCl, à un débit de 30  $\text{ml h}^{-1}$ . Après rinçage de la colonne, les

protéines sont éluées avec 40 ml d'un tampon en gradient linéaire de 0.06 à 1 M NaCl. La protéine G3BP est éluée entre 0.15 M et 0.2 M NaCl.

## 1.2 - Protocole d'immunisation des souris

Des souris femelles BALB/c âgées de 6 semaines ont reçu une injection intrapéritonéale de 25 µg de G3BP au jour J0 de l'immunisation. Une deuxième injection intrapéritonéale a été faite au jour J14 de l'immunisation puis une troisième et quatrième injections aux jours J45 et J80. Une cinquième injection (10 µg de protéine G3BP) est a été faite par voie intra-veineuse au jour J165 et les splénocytes ont été extraits trois jours plus tard et fusionnés. Les splénocytes ont été fusionnés avec des cellules murines de myélome SP2/O-Ag14 d'une part et X63Ag8/653 d'autre part. Le rapport splénocytes/cellules de myélome est de 5 : 1. L'hybridation lymphocytaire est faite en présence de polyéthylèneglycol PEG pm 1500 (concentration finale 40 %). Il a été préparé 16 plaques de 96 puits en présence de 10.000 macrophages péritonéaux de souris Balb/C par puits. Les quantités de splénocytes utilisées varient entre  $2,5 \cdot 10^4$  et  $10^5$  cellules par puits. Le milieu utilisé contient RPMI 1640 (Biowhittaker et Gibco), 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, HAT, hypoxantine 100 mM, aminoptérine 0.4 µM, thymidine 16 µM, 220 % sérum de veau foetal décomplémenté, pénicilline 100 U/ml, streptomycine 100 µg/ml.

Les premiers clones apparaissent trois jours après la fusion, le milieu est changé sept jours après la fusion, enfin 10 jours après la fusion, 5000 macrophages sont ajoutés par puits. Les puits dans lesquels un seul hybridome a poussé sont identifiés et les surnageants sont prélevés pour le criblage.

Les surnageants d'hybridome issus de la fusion sont criblés par Western Blot. Des extraits cellulaires (50 µg) de cellules ER22 et de cellules HCT116, la protéine G3BP recombinante ainsi qu'une protéine contrôle SAM68 ont été soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 7,5 % de dodecyl sulfate de sodium (SDS-PAGE) puis transférés sur une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF

Millipore Corpo.). La liaison non spécifique est bloquée par 2 % de lait écrémé dans du tampon ECL (20 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05 % de Tween 20) pendant 2 heures, à température ambiante.

5 Les membranes sont ensuite incubées avec les différents surnageants dilués au 1/50<sup>ème</sup> dans le tampon bloquant pendant une nuit à 4 °C. Après lavage avec le tampon ECL - 0.05 % Tween 20, les protéines liées sont détectées par incubation avec un anticorps anti-souris conjugué à une peroxidase et du réactif chemiluminescent ECL (NEN Life Science Product).

10 Trois hybridomes ont été retenus à l'issue de ce criblage. Il s'agit des hybridomes G3B 1E1, G3B 1F1 1D1 et G3B11H7.

### Exemple 2 - Identification de l'épitope reconnu par l'anticorps Mab 1F1.

Différents fragments de la protéine G3BP ont été produits dans un système d'expression en cellule d'insectes (SF9) infectées par un baculovirus recombinant selon la technique décrite dans Parker et al (Mol. Cell. Biol. 16 (1996) 2561). Il s'agit  
15 des fragments « 1 » (aa 72 - 350), « 2 » (aa 72 - 235), « 3 » (aa 144 - 341), « 4 » (aa 236 - 350), et « 5 » (aa 299 - 466). Des expériences de Western blot ont été réalisées à partir de ces fragments produits en système baculovirus.

#### 2.1 - Détection des protéines par Western Blot

20 Après élimination du milieu de culture, les cellules en prolifération sont lavées deux fois en tampon phosphate à 4 °C. La lyse est effectuée directement sur les boîtes de culture en présence de 1 ml de tampon HNTG (HEPES pH 7,5 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1 %, glycerol 10 %, MgCl<sub>2</sub> 1mM, 1 mM + inhibiteurs de phosphatases (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, Na<sub>4</sub> P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 10 mM, NaF 10 mM) + inhibiteurs de  
25 protéases (leupeptine 1 µg/ml, inhibiteur de trypsine 1 µg/ml, pepstatine A 1 µg/ml, benzamidine 10 µg/ml, phenylmethylsulfonyl fluoride 1mM, antipaine 1 µg/ml

chymostatin 1 µg/ml). Les protéines sont séparées sur gel d'électrophorèse acrylamide Sodium Dodecyl-Sulfate (SDS)-Polyacrylamide (PAGE) de 7.5 % (16 heures, 60 volts) les protéines sont ensuite transférées sur membrane de polyvinylidene difluoride (PVDF) Millipore Corp.) par une méthode de transfert semi-liquide. Le

5 transfert est réalisé à 4 °C, pendant 3 heures, sous tension de 60 volts, dans un tampon de transfert Tris Base 25 mM, Glycine 192 , SDS 0.15 % méthanol 20 %. La membrane est rincée en PBS puis saturée dans du PBS additionné de 0.05% de tween 20 et de 2 % de lait écrémé pendant 2 heures à température ambiante. La membrane est incubée pendant 12 h à 4 °C, dans un tampon ECL (20 mM TRIS, pH 7.4, 150

10 mM NaCl) + 0.05 % Tween 20 + 2 % lait écrémé, contenant le premier anticorps. L'anticorps MAB 1F1 est dilué au 1/10000 ème. La membrane est ensuite rincée 4 ou 5 fois pendant 10 minutes, à température ambiante dans un tampon ECL + 0.05 % Tween 20. Le second anticorps (anticorps anti-souris) est ensuite ajouté en présence de ECL + 0.05 % Tween 20 pendant 45 minutes à température ambiante. Les

15 anticorps sont couplés à la peroxydase qui permet la révélation des protéines par la technique de l'Enhanced ChemiLuminescence (ECL). La membrane est rincée 4 ou 5 fois dans du tampon PBS + 0.05 % Tween 20, incubée 1 minute dans le réactif ECL. La révélation est effectuée selon les recommandations du fournisseur (NEN Life Science-Product).

20 Les résultats sont présentés sur la figure 1 et montrent que l'anticorps Mab 1F1 permet la détection des fragments « 1 » (aa 72 - 350) et « 2 » (aa 72 - 235). Le fragment « 3 » (aa 144 - 341) central comportant une zone commune au fragment « 2 » n'est pas reconnu. Les fragments « 4 » (aa 236 - 350) et « 5 » (aa 299 - 466) ne sont pas non plus reconnus.

25 Ces résultats montrent que l'épitope reconnu par l'anticorps Mab 1F1 est localisé dans la région N- terminale de la protéine de G3BP, dans la zone correspondant aux 144 premiers acides aminés et plus particulièrement dans la zone comportant les 100 premiers amino acides situés en amont du domaine acide (aa 144 - 221) de la protéine G3BP.

**Exemple 3 : niveau d'expression de la protéine G3BP dans différentes lignées cellulaires.**

Le niveau d'expression de la protéine G3BP a été étudié dans des tumeurs  
5 colorectales humaines et dans différentes lignées tumorales.

**3.1 - Niveau d'expression de G3BP dans différentes lignées cellulaires humaines.**

Pour cette expérience, les cellules en culture sont récoltées par scrapping et centrifugées 5 mn à 2000 t/mn pour les collecter en culot. Elles sont alors lysées dans  
10 un tampon Hepès 10 mM pH7.2, KCl 140 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NP40 0.2% et inhibiteurs de protéases pendant 45 mn à 4 °C. Les lysats sont centrifugés à 14 000t/mn pendant 10 mn et les surnageants sont prélevés. Un dosage de protéines est effectué et les surnageants sont dénaturés en tampon de Laemmli 4X et traités 10 mn à 95°C.

15 L'équivalent de 50 µg de protéines des différents lysats est déposé par puits d'un minigel SDS-PAGE Novex 10% d'acrylamide, 10 puits et 1.5mm d'épaisseur.

Après migration, électrotransfert sur membrane de PVDF, et passivation des membranes en tampon TTBS [TRIS 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Tween 20 0.1 %, azide de sodium 0.02 %] contenant 3 % de BSA, les échantillons sont soumis à un  
20 Western-blot :

Les membranes sont incubées pendant 2 heures avec l'anticorps Mab 1F1 dilué à 0.2µg/ml dans du tampon TTBS contenant 3% de BSA, elles sont ensuite rincées quatre fois avec du TTBS pendant 10 mn, puis incubées 1 heure avec un anticorps anti-souris marqué à la peroxydase et à nouveau rincées quatre fois avec du  
25 TTBS pendant 10 mn. Les membranes sont ensuite révélées avec le kit ECL (chimie luminescence) NEN-Dupont sur film ECL Amersham.

Les résultats sont présentés à la figure 2 a. Le film obtenu montre la surexpression de la protéine G3BP dans toutes les lignées tumorales testées, par rapport à la lignée de fibroblastes normaux NHDF. Le niveau de cette surexpression est variable d'une lignée à l'autre mais n'est pas dépendant de l'état d'activation des gènes *ras* dans ces lignées ; les lignées cellulaires présentant un gène *Ki-ras* muté comme les HCT116, H460 ou DLD-1, expriment plus ou moins fortement la protéine G3BP et les lignées cellulaires ne présentant pas de mutation des gènes *ras* comme les HeLa ou HT29, ont un niveau d'expression de G3BP tout aussi fort et variable.

On peut néanmoins constater que les cellules HKe-3 et HK2-6 dans lesquelles le gène *Ki-ras* a été délété, voient le niveau d'expression de G3BP diminuer par rapport aux cellules dont elles sont issues, les HCT116, sans pour autant qu'il y ait extinction de cette expression.

#### Niveau d'expression de G3BP dans les biopsies humaines.

Les prélèvements de tissus sains ou tumoraux ont été fixés sur lame. La solubilisation des échantillons est effectuée par un dépôt de 40 µl de tampon HNTG sur chaque lame au niveau du tissu. Les extraits sont centrifugés à 14000t/min pendant 10 minutes et les surnageants sont prélevés. Les protéines sont dosées et dénaturées par du tampon de Laemmli 4X par un traitement à la chaleur 95 °C pendant 10 minutes.

Des échantillons de 20 à 30 µg de protéines ont été soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 7,5 % de dodecyl sulfate de sodium (SDS-PAGE) puis transférés sur une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF Millipore Corpo.). La liaison non spécifique est bloquée par 2 % de lait écrémé dans du tampon ECL (20 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05 % de Tween 20) pendant 2 heures, à température ambiante.

Les membranes sont ensuite incubées avec l'anticorps Mab 1F1 dilué à 0.2 µg/ml dans le tampon bloquant pendant une nuit à 4 °C. Après lavage avec le tampon

ECL - 0.05 % Tween 20, les protéines liées sont détectées par incubation avec un anticorps anti-souris conjugué à une peroxidase et du réactif chemiluminescent ECL (NEN Life Science Product)

Les résultats présentés sur la figure 2 b montrent que la protéine G3BP est  
5 surexprimée dans les adénomes moyennement et bien différenciés.

**Exemple 4 : Effet de la microinjection de l'anticorps Mab 1F1 sur la viabilité des cellules tumorales humaines.**

Cet exemple illustre la propriété des anticorps selon l'invention à induire  
10 l'apoptose dans différents types de cellules tumorales.

L'anticorps monoclonal Mab 1F1 a été injecté selon le protocole décrit ci-après. La solution à injecter est dialysée contre du PBS, passée sur filtre 0.45µm UltraFree Millipore et centrifugée (5 mn à 14000 rpm) avant d'être introduite dans le microcapillaire à l'aide d'une pointe effilée « microloader » (Roucaire). Le temps  
15 d'injection est réglé de 0,1 à 0,3 seconde et la pression d'injection entre 50 hPa et 150 hPa selon la taille des cellules. Environ 200 cellules ont été injectées par condition.

Les cellules HCT116, H460, H1299, HeLa ou HKe-3 ont été microinjectées par 10 mg/ml d'anticorps monoclonal Mab 1F1 puis filmées et enregistrées par vidéomicroscopie (à 2 images par minute) pendant 3 jours après injection. A la lecture  
20 du film, l'évolution des cellules injectées est observable (divisions, morts cellulaires, changements morphologiques) et quantifiable (nombre de cellules se divisant ou mortes par heure). Seules les cellules qui se détachent du support après condensation et fragmentation (événements observables des cellules apoptotiques) sont comptées.

Les résultats obtenus avec l'injection de l'anticorps Mab 1F1 dans les cellules  
25 HCT 116 sont reportés dans la figure 3. On constate un pourcentage élevé de mort



cellulaire induite à partir de douze heures après l'injection de l'anticorps Mab 1F1, avec un pic entre 24 et 48 heures.

- Des doses différentes d'anticorps Mab 1F1 ont été testées dans les cellules HCT116. De 10 mg/ml à 3 mg/ml, l'effet d'induction de mort cellulaire est équivalent, c'est-à-dire que l'anticorps Mab 1F1 induit la mort cellulaire d'au moins 50% des cellules injectées. A 1 mg/ml d'anticorps, l'effet est fortement diminué.

Si les cellules HCT116 sont injectées par une immunoglobuline de souris à la concentration de 10 mg/ml comme contrôle, aucune mort n'est constatée et les cellules injectées continuent à se diviser normalement.

- 10 Cet effet toxique de l'anticorps Mab 1F1 dans les cellules HCT116 a été confirmé par l'utilisation de la méthode « TUNEL » en fluorescence, qui permet de détecter spécifiquement les coupures dans l'ADN des cellules entrant en apoptose:

- Les cellules sontensemencées sur des lamelles de verre quadrillées (cellocates-Roucaire) et placées dans des plaques 4 puits. 2 jours après l'ensemencement, les cellules sont injectées sur ces lamelles par l'anticorps Mab 1F1 ou avec une immunoglobuline de souris, comme contrôle, à 10 mg/ml. Après injection, les cellules sont replacées à l'étuve pendant 40h. Elles sont alors fixées à la formaldéhyde 4% pendant 15 mn, perméabilisées 5 mn au triton X100 à 0.2% et rincées plusieurs fois avec du tampon phosphate. On procède alors au double marquage pendant 1h à 37°C avec :
- 15
- 20

- un anticorps anti-souris marqué au Texas Red dilué au 1/400, qui révélera les cellules injectées,

- kit Boehringer « In situ cell death detection » qui marquera spécifiquement en vert, les coupures dans l'ADN des cellules apoptotiques.

- 25 Les lamelles sont ensuite montées sur lames de verre en milieu de montage (Vectashield-Biosys).

A l'observation en lumière fluorescente, à l'aide de filtres sélectionnant les différentes couleurs, les cellules injectées d'une part et les cellules en apoptose d'autre part, sont comptabilisées.

- On obtient ainsi, dans 3 expériences indépendantes, entre 9 et 18% de cellules HCT116 mortes par apoptose au temps 40h. Dans les mêmes conditions, on ne constate la mort d'aucune cellule HCT116 injectée par l'immunoglobuline contrôle.

- Les expériences d'enregistrement après microinjection de l'anticorps Mab 1F1, ont été reproduites avec les cellules H460, H1299, HeLa et HKe-3 avec des résultats similaires au graphe présenté dans la figure 3 montrant qu'au moins 50% des cellules injectées meurent de 12 à 60h après injection.

Les expériences de marquage « TUNEL » ont été réalisées avec les cellules HCT116 et H460 et ont donné des résultats équivalents (de 9 à 18% des cellules entrant en apoptose 40 heures après injection de l'anticorps).

#### Exemple 5 : Effet de la microinjection de l'anticorps Mab 1F1 sur la viabilité et sur la prolifération des fibroblastes humains normaux NHDF

##### 5.1 - Effet de la microinjection de l'anticorps Mab 1F1 sur la viabilité des fibroblastes humains normaux NHDF.

- Les expériences d'enregistrement des cellules NHDF en prolifération microinjectées par l'anticorps Mab 1F1 montrent qu'aucune mort cellulaire n'est constatée dans les 60h après injection et que les cellules continuent à se diviser normalement.

##### 5.2 - Effet de la microinjection de l'anticorps Mab 1F1 sur la prolifération des fibroblastes humains normaux NHDF.

Les cellules normales en culture ont besoin de l'apport en facteurs de croissance. Si elles sont privées de ces facteurs elles entrent dans une phase de « non-prolifération » dite de quiescence où elles ne répliquent plus leur ADN et ne peuvent donc plus incorporer la bromodéoxyuridine, un analogue de la thymidine ajouté dans le milieu de culture, que seules les cellules en prolifération peuvent incorporer dans leur ADN.

Lorsqu'on microinjecte dans des cellules NHDF quiescentes, l'anticorps Mab 1F1 à la concentration de 10 mg/ml, et que l'on remet ces cellules dans un milieu contenant des facteurs de croissance et de la bromodéoxyuridine (BrdU), on constate, après 24h de contact puis fixation et coloration à l'aide d'un anticorps anti-BrdU, une inhibition de 33% de la prolifération cellulaire.

Cette inhibition est calculée en rapportant le pourcentage de cellules injectées par l'anticorps Mab 1F1 et qui ont incorporé la BrdU, au pourcentage de cellules injectées par une immunoglobuline de souris et qui ont incorporé la BrdU (contrôle).

Un autre anticorps monoclonal anti-G3BP (11H7) a été injecté dans les cellules NHDF dans les mêmes conditions.

Anticorps injecté	% d'incorporation BrdU
Immunoglobuline de souris (IgG)	44.7
Mab 1F1	29.7
11H7	30.3

Tableau 1 : effet de l'injection d'anticorps spécifiques de G3BP sur la croissance cellulaire de cellules NHDF

On constate que l'immunoglobuline n'empêche pas la prolifération cellulaire alors que l'anticorps 11H7 a un effet similaire à celui de l'anticorps Mab 1F1, à savoir qu'ils provoquent une inhibition de la prolifération de 32 à 33%.

5 On attribue cette inhibition au blocage de la protéine G3BP endogène par l'anticorps Mab 1F1 ou 11H7. A cet égard il est intéressant de noter que cet arrêt de prolifération n'est que temporaire dans les cellules normales NHDF et n'entraîne en aucun cas la mort des cellules. En effet, les cellules reprennent leur cycle normal lorsque l'anticorps est naturellement dégradé dans le cytoplasme (environ 40h après l'injection).

10 Les résultats présentés dans les exemples 4 et 5 montrent que l'anticorps Mab 1F1 induit l'apoptose dans au moins 50% des cellules tumorales humaines testées dans lesquelles G3BP est surexprimée mais se révèle non toxique lorsqu'il est injecté dans les cellules humaines normales, où G3BP est faiblement exprimée. Cet effet dans les cellules tumorales n'est apparemment pas lié à l'état d'activation des gènes  
15 *ras*. Par ailleurs, l'anticorps Mab 1F1, provoque un arrêt temporaire - ou un retard - de la prolifération des cellules normales NHDF, lorsqu'il est injecté dans les cellules quiescentes.

---

**Exemple 6 - Clonage et expression d'une séquence d'ADN codant pour un anticorps intracellulaire anti -G3BP à partir de l'hybridome G3B 1F1 1D1.**

20 Cet exemple décrit le clonage et l'expression d'une séquence d'acides nucléiques codant pour un anticorps intracellulaire reproduisant les propriétés de l'anticorps monoclonal Mab 1F1.

**6.1 - Préparation de la séquence d'ADN.**

25 Une séquence d'ADN codant pour un anticorps intracellulaire (fragment ScFv) est préparée selon la technique décrite dans le brevet US 4,946,778. Cette séquence est ensuite placée sous le contrôle d'un promoteur fonctionnel dans les cellules mammifère.

Les ARN poly A sont isolés à partir d'une culture cellulaire de l'hybridome G3B 1F1 1D1, selon la technique décrite par Chirguin S.H. et al (Biochemistry 18, 5294 (1979)). Ces ARN sont utilisés pour une réaction de Réverse-Transcription à l'aide de primers murins formés d'hexanucléotides aléatoires. Les ADNc obtenus

5 servent de matrice à deux réactions de PCR

- l'une destinée à amplifier le fragment variable de la chaîne lourde (VH) avec des primers VH spécifiques,

- une deuxième PCR permettant d'obtenir le fragment VL, en utilisant un mélange de 10 primers dérivés des séquences murines.

10 Deux fragments de 340 bp et 325 bp sont ainsi obtenus et assemblés grâce à un linker qui permet un positionnement correct de l'ADNc de VH en 5' de celui de VL. PCR (Recombinant Phage Antibody System Mouse ScFv Module, Pharmacia, 27-9400-01).

15 La séquence d'acides nucléiques fusionnée VH-linker-VL est ensuite insérée dans un phagemide qui permet l'expression de l'anticorps intracellulaire. Cette expression permet facilement l'identification et la sélection des anticorps intracellulaires qui reconnaissent correctement l'antigène. Cette étape est réalisée en sélectionnant les anticorps capables de reconnaître G3BP en test ELISA (Recombinant Phage Antibody System Expression Module, Pharmacia, 27-9401-01).

## 20 6.2 - Evaluation fonctionnelle de l'anticorps intracellulaire modifié.

La séquence qui code pour l'anticorps intracellulaire modifié anti-G3BP est isolée du phagemide par restriction, puis insérée dans le vecteur SV2 (Schweighoffer et al., Science, 256, 825-827 (1992)) ou pCDNA3 (InVitrogen, V790-20). Le plasmide ainsi obtenu est appelé pSV-ScFvG3BP ou pCDNA3ScFvG3BP.

25 L'évaluation fonctionnelle peut être réalisée au moyen des tests décrits ci-dessous.

a) par microinjection dans les cellules mammifères non immortalisées NHDF et dans des lignées transformées (HCT116, H460, Hke-3, H1299, Hela) en examinant l'apoptose dans les lignées transformées suivant les techniques décrites précédemment et en mesurant l'impact de l'anticorps intracellulaire anticorps sur la  
5 viabilité cellulaire par comparaison avec l'activité de l'anticorps Mab 1F1.

b) par un test de néo-résistance sur les lignées transformées et les cellules normales. Le plasmide pCDNA3G3BP est transfecté dans les lignées transformées (HCT116, Hke-3, H460, H1299, Hela) ainsi que dans des cellules humaines non transformées. Trois jours après transfection, les cellules transformées sont  
10 sélectionnées en présence de généticine. Dans ce test, l'anticorps simple chaîne est comparé à des fragments de G3BP (dont les séquences d'acides nucléiques correspondantes sont incluses dans les mêmes vecteurs d'expression) qui inhibent la croissance des cellules tumorales.

c) par l'inhibition de la formation de foyers. La capacité de l'anticorps simple  
15 chaîne à inhiber la formation de foyers est réalisée selon la technique décrite dans WO94/29446. Pour les tests de diminution de la capacité tumorale, l'effet peut également être recherché dans le cas de transformation par d'autres oncogènes que Ras.

d) en recherchant l'impact de l'expression de ce ScFv sur l'activité de liaison à  
20 l'ARN et/ou la coupure endonucléolytique de l'ARN par G3BP1. En effet, l'apoptose induite par microinjection de l'anticorps monoclonal Mab 1F1 peut s'expliquer soit par la dissociation d'une interaction avec un partenaire protéique spécifique, soit par une modification de l'activité de liaison à l'ARN et/ou de clivage endoribonucléolytique. L'anticorps ScFv obtenu peut également être caractérisé par sa  
25 capacité à modifier ces interactions.

**Exemple 7 : Identification d'un autre domaine de reconnaissance de l'anticorps Mab 1F1 sur la protéine G3BP1. Comparaison de séquences entre les protéines humaines G3BP et G3BP2 (ou G3BPh).**

La protéine G3BP fait partie d'une famille de protéines dans laquelle se trouvent les protéines G3BP2 courte (AF 051311, Genbank) qui présente 60.9% d'identité au niveau nucléotidique, et 58.9% au niveau protéique avec G3BP, et la protéine G3BP2 longue (AB 014560, Genbank). La protéine G2BP2, forme longue, présente une insertion de 99 nucléotides en 790 dans la séquence de G3BP2 (forme courte).

La comparaison des séquences protéiques entre les protéines G3BP et G3BP2 fait apparaître une conservation des principaux domaines de la protéine, à savoir :

- 1 - une région N-Terminale (présentant des homologies avec la protéine NTF2, Nuclear Transport Factor 2), cible de l'anticorps monoclonal Mab1F1,
- 2 - une région acide,
- 3 - une région riche en motifs PXXP impliqués dans les interactions protéines-protéines,
- 4 - une région comportant des domaines RRM de reconnaissance à l'ARN, et des motifs auxiliaires, des boîtes « RGG »(arginine, glycine, glycine).

De façon remarquable, l'anticorps monoclonal Mab1F1 n'est pas capable de reconnaître la protéine recombinante G3BP2 (forme courte) dans des expériences de Western-blot. La comparaison des séquences N-terminale fait apparaître plusieurs différences mises en évidence par les trémas dans la figure 4.

L'utilisation de peptides recouvrant les différentes régions divergentes a permis de préciser le domaine de reconnaissance de l'anticorps sur la protéine G3BP.

Dans un premier temps, la comparaison des séquences des protéines décrite ci-dessus a permis de synthétiser différents peptides (A-F) :

Peptide A : LLNQAPDMLHRFY

acides aminés 22-34 de la protéine G3BP

Peptide B : LLNKAPEYLHRFY

acides aminés 22-34 de la protéine G3BP2

Peptide C : HGGLDSNGKPADAV

5 acides aminés 42-55 de la protéine G3BP

Peptide D : HGGVDASGKPQEAV

acides aminés 42-55 de la protéine G3BP2

Peptide E : LLSNNNQALRRFMQ

acides aminés 97-111 de la protéine G3BP

10 Peptide F : HNDIFRYQDEVFG

acides aminés 127-139 de la protéine G3BP

Ces peptides ont ensuite été testés :

(i) pour leur capacité à reconnaître l'anticorps Mab1F1 dans un test ELISA ,

(ii) pour leur capacité à inhiber la reconnaissance de la protéine G3BP par

15 l'anticorps Mab1F1 dans des expériences de Western-blot.

(i) Test des peptides A-F dans un test ELISA

20 Les peptides en solution à 10mg/ml dans du tampon carbonate ( 0.1M, pH 9.6) ont été fixés par adsorption pendant une nuit à 4°C sur des plaques 96 puits. Après un lavage en PBS , les puits ont été saturés pendant 4 heures à température ambiante dans du tampon PBS/BSA 1%. Après trois lavages en PBS/Tween 0.05%, les différents puits ont ensuite été mis en contact avec des dilutions de l'anticorps purifié Mab1F1 dans du PBS/ BSA 0.2% ( 10 ng/ml à 1 pg/ml) pendant 1 heure à



température ambiante. Après trois lavages en tampon PBS/Tween 0.05%, les puits ont été incubés avec une dilution de l'anticorps anti-souris couplé à la peroxydase (dilution 1/1000 dans PBS/BSA 0.2%) (Pharmacia) pendant 1 heure à température ambiante. Après trois lavages en tampon PBS/Tween 0.05%, la réaction colorimétrique a été développée en mélangeant : 10ml d'H<sub>2</sub>O, un comprimé OPD, 100ml de méthanol, et 25 ml d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La réaction a été arrêtée avec 50ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N, et la lecture spectrophotométrique a été faite à 492nm (filtre de référence 620nm).

Les résultats obtenus montrent que le peptide A est le plus réactif dans ce test et se révèle capable de reconnaître l'anticorps Mab1F1 dans un test ELISA. Ces résultats indiquent que l'épitope reconnu par l'anticorps Mab1F1 est situé dans le domaine défini par les acides aminés 22 à 34 de G3BP. Les mêmes expériences réalisées avec l'anticorps 1E1 ont conduit à des résultats identiques.

(ii) Test des peptides A-F pour leur capacité à inhiber la reconnaissance de la protéine G3BP par l'anticorps Mab1F1 dans des expériences de Western-blot.

La détection des protéines par Western-blot a été réalisée selon la technique décrite dans l'exemple 2 (2.1 : Détection des protéines par Western-blot). Pour les compétitions, l'anticorps a été pré-incubé pendant deux heures à 37°C avec une dilution du peptide avant d'être mis en contact avec la membrane. Pour chaque peptide, deux concentrations ont été testées : excès molaire de 10 et de 100 par rapport à l'anticorps. La révélation a ensuite été faite comme décrit dans l'exemple 2.1.

Les résultats obtenus montrent que les peptides A et C sont capables de déplacer l'interaction entre la protéine G3BP et l'anticorps Mab1F1 (principalement avec un excès molaire 100X).

L'ensemble de ces résultats désignent le peptide A (acides aminés 22-34 de G3BP) et le peptide C (acides aminés 42-55 de G3BP) comme correspondant à des domaines de G3BP intervenant dans la reconnaissance avec l'anticorps Mab1F1.

- La comparaison de séquence entre G3BP et G3BP2 forme courte a donc
- 5 permis l'identification de différents peptides et la mise en évidence de leur rôle dans le contrôle de l'apoptose par G3BP, ces résultats permettent d'envisager différentes applications et notamment l'utilisation ces peptides pour de la modélisation moléculaire, afin d'obtenir de petites molécules qui miment les effets de ces peptides ou de polypeptides les incorporant. Par ailleurs, ces peptides peuvent être utilisés pour
- 10 déplacer une interaction de la protéine G3BP avec un partenaire cellulaire ; ce partenaire cellulaire peut être G3BP lui-même puisqu'il a été montré que la protéine est capable de dimériser, ce partenaire peut également être un partenaire connu (RasGAP) ou un partenaire nouvellement identifié. A cet effet, ces peptides couplés à une résine peuvent être utilisés pour la recherche de partenaire cellulaire de G3BP.
- 15 Enfin, un criblage de molécules d'intérêt thérapeutique peut être établi sur la base de l'inhibition d'une interaction protéine-protéine.

#### **Exemple 8. Construction de fragments de G3BP1 et activité apoptotique de ces fragments.**

20

Au vu des résultats obtenus dans l'exemple 7, des plasmides permettant l'expression de fragments N-terminaux de G3BP ont été construits en vue de tester l'activité apoptotique de ces fragments. Pour cela, les fragments ont été amplifiés par PCR à partir des amorces suivantes :

25

A - oligonucléotide 5' dans G3BP (nucléotide 1)

cccgatcgacatggatgatggagaagcctagtagccctg

B - oligonucléotide 5' dans G3BP (nucléotide 42)

cccgggtcgactttgtgagacagtattacaca

C - oligonucléotide 3' dans G3BP (nucléotide 150)

cccgggtgcggccgctttccatttgaatccaatcc

5

Les fragments (1-150) et (42-150) ont été amplifiés par PCR (30 cycles à 50°C), hydrolysés par les enzymes de restriction Sall et NotI, puis insérés dans le vecteur commercial pCMV / cyto (Invitrogen, pShooter Vector manual II, version C).

10

Les séquences des fragments obtenus sont décrites ci-dessous : les séquences provenant du vecteur et qui seront traduites sont inscrites en majuscules, les séquences du cDNA G3BP sont indiquées en minuscules. Les régions soulignées correspondent aux séquences du vecteur codant pour le Tag myc).

15 - (fragment 1-150)

5' ATGCCCCAGGTGCAGCTGCAGGTCatggtgatggagaagcctagtagccctgctggtc  
gggcgggaattgtgagacagtattacacactgctgaaccaggccccagacatgctgcatagatttatggaaag  
aactcttcttatgtccatgggggattggattcaaatggaaagGCGGCCGCAGAACAAAACT  
20 CATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGGGCCGCATAG 3'

20

Le polypeptide correspondant est présenté ci-dessous. Ce polypeptide comprend le fragment correspondant aux acides aminés 1 à 50 de la protéine G3BP dont la séquence est présentée dans la séquence SEQ ID N°1, ce fragment apparaît ci-

25 dessous en caractère gras.

MAQVQLQVMVMEKPSPLLVGREFVRQYYTLLNQAPDMLHRFYGKNSSY  
VHGGLDSNGKAAA EQKLISEEDLNGAA

(fragment 42-150)

5

5'ATGGCCCAGGTGCAGCTGCAGGTCtttgtagacagtattacacactgctgaaccagg  
ccccagacatgctgcatagatttatggaaagaactcttcttatgtccatgggggattggattcaaatggaaagGC  
GGCCGCAGAAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGGGC  
CGCATAG 3'

10

Le polypeptide correspondant est présenté ci-dessous. Ce polypeptide comprend le fragment correspondant aux acides aminés 15 à 50 de la protéine G3BP dont la séquence est présentée dans la séquence SEQ ID N°1, ce fragment apparaît ci-dessous en caractère gras.

15

MAQVQLQVFVRQYYTLLNQAPDMLHRFYGKNSSY**VHGGLDSNGKAAAE**  
**QKLISEEDLNGAA**

20

Les constructions comportant les fragments 1-150 et 42-150 de la séquence nucléotidique de G3BP ont été transfectées dans des lignées transformées NIH3T3Ras et NIH3T3Raf. Ces lignées ont été obtenues après transformation de cellules NIH3T3 par l'oncogène Ki-RasVal12, ou par la forme virale oncogénique de v-Raf.

25

Pour la détection de l'apoptose, 2 mg de plasmide ont été transfectés par la lipofectamine (Gibco-BRL), et l'apoptose a été mesurée 48 heures après la transfection par une analyse au FACS. Les cellules en apoptose correspondent aux cellules en phase subG1.

Dans ces conditions, la construction exprimant le fragment 1-150 de la séquence de G3BP (codant pour le fragment de G3BP comprenant les acides aminés 1

à 50) est capable d'induire l'apoptose (facteur 4) , alors que la construction exprimant le fragment 42-150 de la séquence de G3BP (codant pour le fragment de G3BP comprenant les acides aminés 15 à 50) ne présente pas cette propriété.

Ces résultats désignent le domaine correspondant aux acides aminés 1 à 14 de G3BP comme un domaine impliqué dans l'induction de l'apoptose. L'identification de ce domaine de G3BP et la mise en évidence du rôle des polypeptides comprenant le domaine correspondant aux acides aminés 1 à 14 de G3BP dans le contrôle de l'apoptose permet d'envisager l'utilisation de ces polypeptides pour la prévention, l'amélioration et/ou le traitement des pathologies impliquant une hyperprolifération cellulaire.

#### **Exemple 9. Construction de protéines de fusion avec des fragments de huG3BP1.**

Des constructions permettant l'expression des peptides identifiés dans l'exemple 7 sont réalisées. Les séquences correspondant aux peptides sont fusionnées à la protéine GST(Glutathion S-transférase) afin de les stabiliser.

Séquences des oligonucléotides :

Chaque oligonucleotide sens est bordé en 5' de 4 nucléotides pour reconstituer un site NcoI, et en 3' d'un codon stop (TAA) et d'un nucléotide pour former un site BamHI.

sq22s :           tatgctgctgaaccaggcccccagacatgctgcatagattttattaag

sq22as :           gatacctaataaaatctatgcagcatgtctggggcctggttcagcagca

(séquence 66-105)

sq 44gls : tatgggattggattcaaattggaaagccagcagatgcagtctaag

sq44glas : gatccttagactgcatctgctggctttccatttgaatccaatccca

(séquence 130-166)

5 sq44g2s : tatgggagtagatgctagtggaaagccccaggaagctgtttaag

sq44g2as : gatccttaaacagcttcctggggctttccactagcatctactcca

(séquence 130-166)

sq64s : tatgcagaaagaaatccacaggaaagtgatgtcacaaaacttctaag

10 sq64as : gatccttagaagttttgtgacatcactttcctgtggatttcttctgca

(séquence 172-211)

sq65s : tatgaaagtgatgtcacaaaacttcaccaactgctaag

sq65as : gatccttagcagttggtgaagttttgtgacatcactttca

15 (séquence 190-220)

Les oligonucleotides sont hybridés par paire par refroidissement de 80°C à température ambiante, phosphorylés par la T4 Polynucléotides Kinase (Boehringer), et insérés dans le vecteur « pBCcol1GSTfusion » aux sites NcoI et BamHI. Ce vecteur permet l'expression dans les cellules eucaryotes d'une protéine de fusion GST à partir du promoteur SV40 (Genbank, X78316). Les plasmides sont alors transfectés

20

dans des lignées tumorales humaines, Hela et H1299 (décrites dans le matériel et méthodes) ; l'apoptose induite est mesurée au FACS comme décrit dans l'exemple 8.

## LISTE DE SEQUENCES

5 (1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

(A) NOM: RHONE-POULENC RORER S.A.

(B) RUE: 20, avenue Raymond ARON

(C) VILLE: ANTONY

(E) PAYS: FRANCE

(F) CODE POSTAL: 92165

(ii) TITRE DE L'INVENTION: PEPTIDE CAPABLE DE SE LIER AU DOMAINE SH3 DE LA PROTEINE GAP.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES:2

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Tape

(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible

(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS

(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 466 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

Met Val Met Glu Lys Pro Ser Pro Leu Leu Val Gly Arg Glu Phe Val  
1 5 10 15

Arg Gln Tyr Tyr Thr Leu Leu Asn Gln Ala Pro Asp Met Leu His Arg  
20 25 30

Phe Tyr Gly Lys Asn Ser Ser Tyr Val His Gly Gly Leu Asp Ser Asn  
35 40 45

Gly Lys Pro Ala Asp Ala Val Tyr Gly Gln Lys Glu Ile His Arg Lys  
50 55 60

Val	Met	Ser	Gln	Asn	Phe	Thr	Asn	Cys	His	Thr	Lys	Ile	Arg	His	Val
65					70					75					80

Asp Ala His Ala Thr Leu Asn Asp Gly Val Val Val Gln Val Met Gly  
85 90 95

Leu Leu Ser Asn Asn Asn Gln Ala Leu Arg Arg Phe Met Gln Thr Phe  
100 105 110

Val Leu Ala Pro Glu Gly Ser Val Ala Asn Lys Phe Tyr Val His Asn



	115	120	125
5	Asp Ile Arg Tyr Gln Asp 130	Glu Val Phe Gly Gly 135	Phe Val Thr Glu Pro 140
10	Gln Glu Glu Ser Glu Glu 145	Glu Val Glu Glu Pro 150	Glu Glu Arg Gln Gln 155 160
15	Thr Pro Glu Val Val Pro 165	Asp Asp Ser Gly Thr 170	Phe Tyr Asp Gln Ala 175
20	Val Val Ser Asn Asp Met 180	Glu Glu His Leu Glu 185	Glu Glu Pro Val Ala Glu 190
25	Pro Glu Pro Asp Pro Glu 195	Pro Glu Pro Glu Gln 200	Glu Pro Val Ser Glu 205
30	Ile Gln Glu Glu Lys Pro 210	Glu Pro Val Leu Glu 215	Glu Thr Ala Pro Glu 220
35	Asp Ala Gln Lys Ser Ser 225	Ser Ser Pro Ala Pro 230	Ala Asp Ile Ala Gln Thr 235 240
40	Val Gln Glu Asp Leu Arg 245	Thr Phe Ser Trp Ala 250	Ser Val Thr Ser Lys 255
45	Asn Leu Pro Pro Ser Gly 260	Ala Val Pro Val Thr 265	Gly Ile Pro Pro His 270
50	Val Val Lys Val Pro Ala 275	Ser Gln Pro Arg Pro 280	Glu Ser Lys Pro Glu 285
55	Ser Gln Ile Pro Pro Gln 290	Arg Pro Gln Arg Asp 295	Gln Arg Val Arg Glu 300
60	Gln Arg Ile Asn Ile Pro 305	Pro Pro Gln Arg Gly 310	Pro Arg Pro Ile Arg Glu 315 320
	Ala Gly Glu Gln Gly Asp 325	Ile Glu Pro Arg Arg 330	Met Val Arg His Pro 335
	Asp Ser His Gln Leu Phe 340	Ile Gly Asn Leu Pro 345	His Glu Val Asp Lys 350
	Ser Glu Leu Lys Asp Phe 355	Phe Gln Ser Tyr Gly 360	Asn Val Glu Leu 365
	Arg Ile Asn Ser Gly Gly 370	Lys Leu Pro Asn Phe 375	Gly Phe Val Val Phe 380
	Asp Asp Ser Glu Pro Val 385	Gln Lys Val Leu Ser 390	Asn Arg Pro Ile Met 395 400
	Phe Arg Gly Glu Val Arg 405	Leu Asn Val Glu Glu 410	Lys Lys Thr Arg Ala 415
	Ala Arg Glu Gly Asp Arg 420	Arg Asp Asn Arg Leu 425	Arg Gly Pro Gly Gly 430
	Pro Arg Gly Gly Leu Gly 435	Gly Gly Met Arg Gly 440	Pro Pro Arg Gly Gly 445
	Met Val Gln Lys Pro Gly 450	Phe Gly Val Gly Arg 455	Gly Leu Ala Pro Arg 460

Gln Glx  
465

5

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2 :

10

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 2129 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

15

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

20

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

	GCTTGCCTGT CAGGTCGACT CTAGAGCCCG GGTACCGAGC TCGAATTCGG CGGGGTTTGT	60
25	ACTATCCTCG GTGCTGTGGT GCAGAGCTAG TTCCTCTCCA GCTCAGCCGC GTAGGTTTGG	120
	ACATATTTAC TCTTTTCCCC CCAGGTTGAA TTGACCAAAG CAATGGTGAT GGAGAAGCCT	180
30	AGTCCCCTGC TGGTCGGGCG GGAATTTGTG AGACAGTATT ACACACTGCT GAACCAGGCC	240
	CCAGACATGC TGCATAGATT TTATGGAAAG AACTCTTCTT ATGTCCATGG GGGATTGGAT	300
	TCAAATGGAA AGCCAGCAGA TGCAGTCTAC GGACAGAAAG AAATCCACAG GAAAGTGATG	360
35	TCACAAAACT TCACCAACTG CCACACCAAG ATTCGCCATG TTGATGCTCA TGCCACGCTA	420
	AATGATGGTG TGGTAGTCCA GGTGATGGGG CTTCTCTCTA ACAACAACCA GGCTTTGAGG	480
40	AGATTCATGC AAACGTTTGT CCTTGCTCCT GAGGGGTCTG TTGCAAATAA ATTCTATGTT	540
	CACAATGATA TCTTCAGATA CCAAGATGAG GTCTTTGGTG GGTGTGTCAC TGAGCCTCAG	600
	GAGGAGTCTG AAGAAGAAGT AGAGGAACCT GAAGAAAGCA GCAAACACCT GAGGTGGTAC	660
45	CTGATGATTC TGGAAC TTTC TATGATCAGG CAGTTGTGAG TAATGACATG GAAGAACATT	720
	TAGAGGAGCC TGTGCTGAA CCAGAGCCTG ATCCTGAACC AGAACCAGAA CAAGAACCTG	780
50	TATCTGAAAT CCAAGAGGAA AAGCCTGAGC CAGTATTAGA AGAAACTGCC CCTGAGGATG	840
	CTCAGAAGAG TTCTTCTCCA GCACCTGCAG ACATAGCTCA GACAGTACAG GAAGACTTGA	900
	GGACATTTTC TTGGGCATCT GTGACCAGTA AGAATCTTCC ACCCAGTGGA GCTGTTCCAG	960
55	TTACTGGGAT ACCACCTCAT GTTGTTAAAG TACCAGCTTC ACAGCCCCGT CCAGAGTCTA	1020
	AGCCTGAATC TCAGATTCCA CCACAAAGAC CTCAGCGGGA TCAAAGAGTG CGAGAACAAC	1080
60	GAATAAATAT TCCTCCCCAA AGGGGACCCA GACCAATCCG TGAGGCTGGT GAGCAAGGTG	1140
	ACATTGAACC CCGAAGAATG GTGAGACACC CTGACAGTCA CCAACTCTTC ATTGGCAACC	1200
	TGCCTCATGA AGTGGACAAA TCAGAGCTTA AAGATTTCTT TCAAAGTTAT GGAAACGTGG	1260

	TGGAGTTGCG	CATTAACAGT	GGTGGGAAAT	TACCCAATTT	TGGTTTTGTT	GTGTTTGATG	1320
	ATTCTGAGCC	TGTTTCAGAAA	GTCCTTAGCA	ACAGGCCCAT	CATGTTTCAGA	GGTGAGGTCC	1380
5	GTCTGAATGT	CGAAGAGAAG	AAGACTCGAG	CTGCCAGGGA	AGGCGACCGA	CGAGATAATC	1440
	GCCTTCGGGG	ACCTGGAGGC	CCTCGAGGTG	GGCTGGGTGG	TGGAATGAGA	GGCCCTCCCC	1500
10	GTGGAGGCAT	GGTGCAGAAA	CCAGGATTTG	GAGTGGGAAG	GGGGCTTGCG	CCACGGCAGT	1560
	AATCTTCATG	GATCTTCATG	CAGCCATACA	AACCCTGGTT	CCAACAGAAT	GGTGAATTTT	1620
	CGACAGCCTT	TGGTATCTTG	GAGTATGACC	CCAGTCTGTT	ATAAACTGCT	TAAGTTTGTA	1680
15	TAATTTTACT	TTTTTTGTGT	GTAAATGGTG	TGTGCTCCCT	CTCCCTCTCT	TCCCTTTCCT	1740
	GACCTTTAGT	CTTTCAC TTC	CAATTTTGTG	GAATGATATT	TTAGGAATAA	CGGACTTTTA	1800
20	CCCGAATTCG	TAATCATGGT	CATAGCTGTT	TCCGTGTGAA	ATTGTTATCC	GCTCACAATT	1860
	CCACACAACA	TACGAGCCGG	AAGCATAAAG	TGTAAAGCCT	GGGGTGCCTA	ATGAGTGAGC	1920
	TAACTCACAT	TAATTGCGTT	GCGCTCACTG	CCCGCTTTCC	AGTCGGGAAA	CCTGTCGTGC	1980
25	CAGCGCATTA	ATGAATCGGC	CAACGCGCGG	GGAGAGGCGG	TTTGCGTATT	GGGCGCCAGG	2040
	GTGGTTTCT	TTTCACCAGT	GAGACGGGCA	ACAGCTGATT	GCCCTTCACC	GCTGGCCCTG	2100
	AGAGAGTTGC	AGCAAGCGGT	CCACGCTGG				2129
30							

## REVENDICATIONS

1. Anticorps monoclonal dirigé contre la protéine G3BP et capable d'induire l'apoptose dans différents types de cellules tumorales.
2. Anticorps monoclonal capable de reconnaître un épitope compris entre les  
5 acides aminés situés aux positions 1 et 144 de la protéine G3BP.
3. Anticorps monoclonal selon la revendication 1 ou 2, capable de reconnaître un épitope compris entre les acides aminés situés aux positions 1 à 72 de la protéine G3BP, de préférence un épitope compris entre les acides aminés situés aux positions 22 à 55 de la protéine G3BP, et de préférence encore un épitope constitué  
10 par les acides aminés situés aux positions 22 à 34.
4. Anticorps selon les revendications 1 à 3 caractérisé en ce qu'il s'agit de l'anticorps Mab 1F1 , sécrété par la lignée d'hybridome G3B 1F1 1D1 déposée le 9 juin 1998 auprès de la C.N.C.M. sous le numéro I-2038.
5. Utilisation d'un anticorps selon l'une des revendications 1 à 4 pour  
15 l'obtention d'un médicament.
6. Utilisation d'un anticorps selon l'une des revendication 1 à 4 pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention des désordres hyperprolifératifs.
7. Composition pharmaceutique comprenant une quantité thérapeutiquement  
20 efficace des anticorps monoclonaux selon l'une des revendications 1 à 4, éventuellement mélangés à un support pharmaceutiquement acceptable, ladite quantité étant thérapeutiquement efficace pour induire l'apoptose dans des cellules tumorales.
8. Lignée d'hybridome susceptible de sécréter des anticorps monoclonaux  
25 selon l'une des revendications 1 à 4.

9. Lignée d'hybridome G3B 1F1 1D1 déposée le 9 juin 1998 auprès de la C.N.C.M. sous le numéro de dépôt I- 2038.

10. Procédé de production d'anticorps monoclonaux capables d'induire l'apoptose dans différentes lignées tumorales caractérisé en ce qu'il comprend (1) la fusion de cellules spléniques d'un animal immunisé à l'aide de la protéine G3BP ou d'un fragment comprenant au moins une partie du domaine N-terminal (aa 1-144), avec des cellules myelomateuses dans des conditions permettant la formation d'hybridomes; (2), la détection et l'isolement de ceux desdits hybridomes qui sécrètent des anticorps monoclonaux capables d'induire l'apoptose dans différentes lignées tumorales.

11. Utilisation d'un anticorps selon l'une des revendications 1 à 4 , comme réactif de diagnostique.

12. Kit de diagnostic caractérisé en ce qu'il comprend un anticorps selon l'une des revendications 1 à 4.

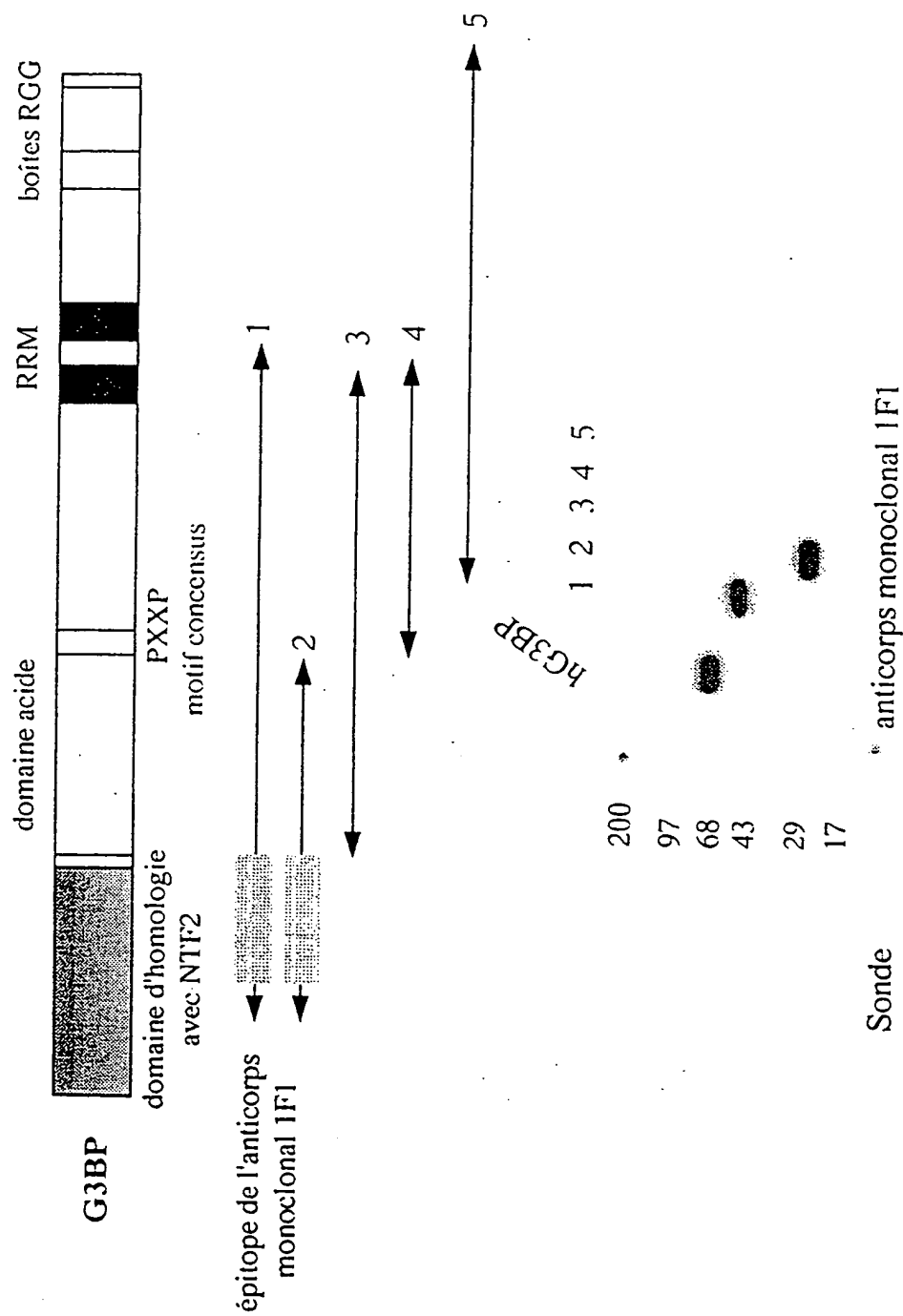
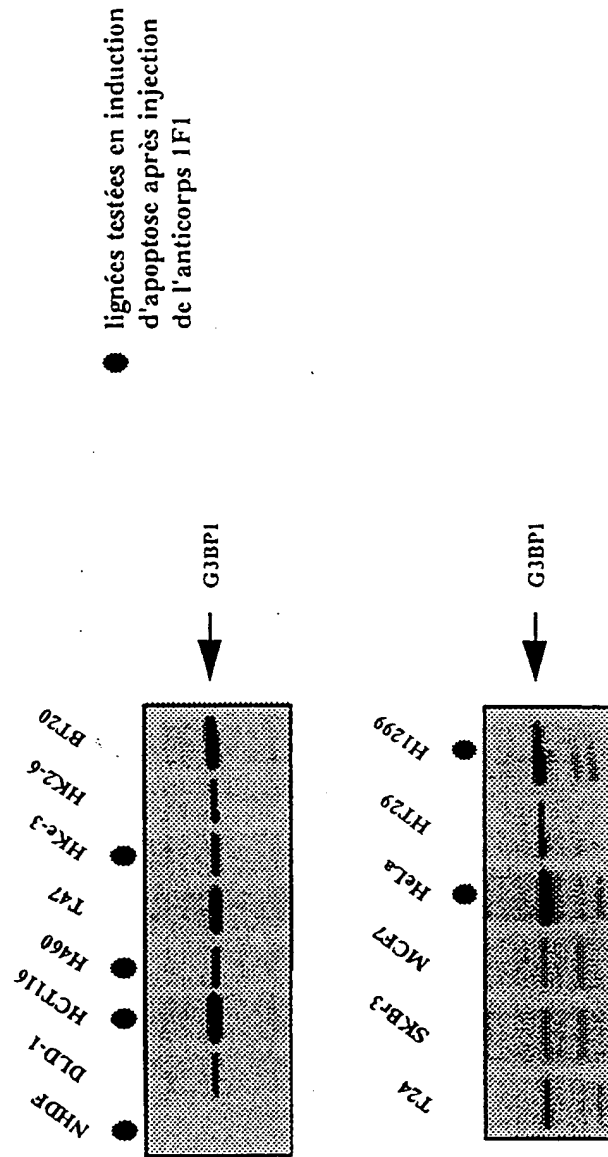


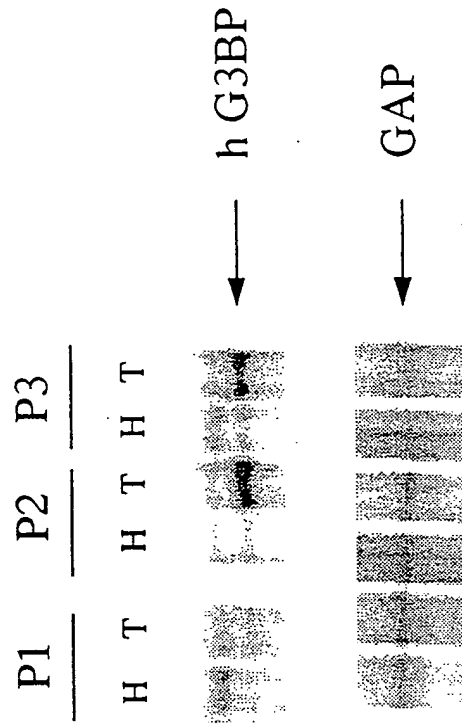
Figure 1

NIVEAU D'EXPRESSION DE G3BP1 DANS DIFFERENTES LIGNEESCELLULAIRES HUMAINES.

Western blot: anti-G3BP MAb 1F1

Figure 2(a)

# SUREXPRESSION DE G3BP DANS LES TUMEURS COLORECTALES HUMAINES



P1: Polype

P2 : Adénome moyennement différencié/Moderately Differentiated Adenocarcinoma

**P3 : Adénome bien différencié**

Figure 2(b)



EFFET DE L'INJECTION DU MAb 1F1 SUR LA  
VIABILITE DES CELLULES HCT116

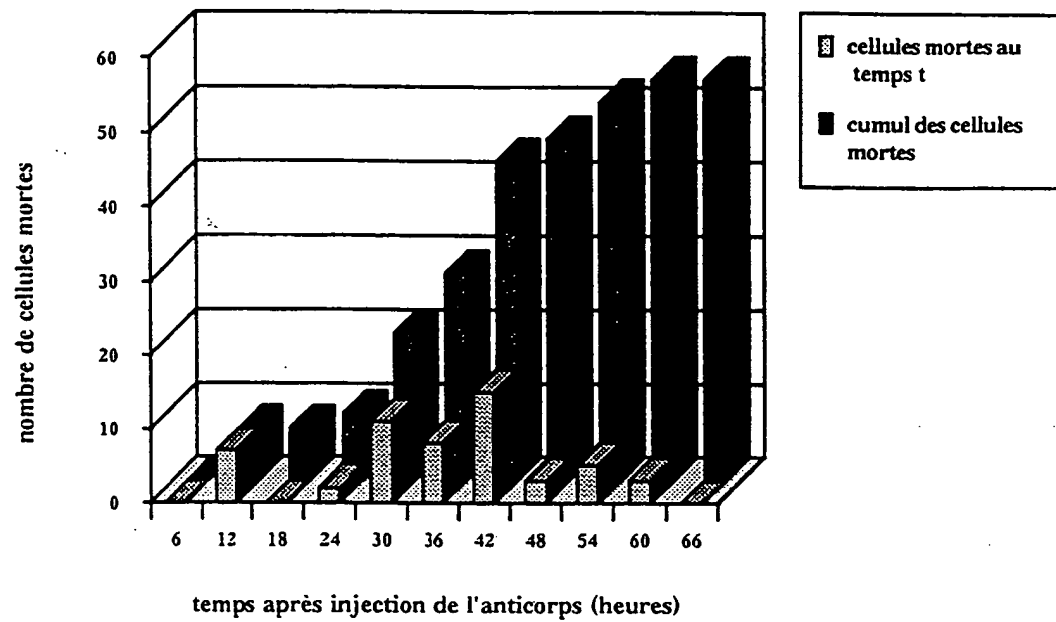


Figure 3

	10	20	30	40	50	
G3BP	MVMEKPSPLLVGREFVRQYYTLLNQAPDMLHRFYGKNSSYVHGGGLDSNGKPADAV					
		:	:	:	:	
G3BP2	MVMEKPSPLLVGREFVRQYYTLLN KAPEYLHRFYGRNSSYVHGGVDASGKPQEA V					
	10	20	30	40	50	
	60	70	80	90	100	110
G3BP	YGQ KEIHRKVMSQNFTNCHTKIRHVDAHATLNDGVVVQVMGLLSNNNQALRRFMQ					
	:	:	:	:	:	:
G3BP2	YGQNDIH HKVL SLNFSECHTKIRHVDAHATLSDGVVV QVMGLLSNSGQPERKFMQ					
	60	70	80	90	100	110
	120	130	140			
G3BP	TFVLAPEGSVANKFYVHND I FRYQDEVFGGFVT					
	:	:	:	:		
G3BP2	TFVLAPEGSVPNKFYVHNDMFRYEDEVFGDSEP					
	120	130	140			

FIGURE 4